[ORGANIZADORES]
RODRIGO PIRES DO NASCIMENTO
MARIA ALICE ZARUR COELHO
BERNARDO DIAS RIBEIRO
KAREN SIGNORI PEREIRA

MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

BIOPROCESSOS

+ VOLUME 1

Material na WEB
www.evolution.com.br

ELSEVIER

Microbiologia Industrial: Bioprocessos

Volume I

Rodrigo Pires do Nascimento

Maria Alice Zarur Coelho

Bernardo Dias Ribeiro

Karen Signori Pereira

(Organizadores)

ELSEVIER

Sumário

Copyright

ISBN: 978-85-352-8724-0
ISBN (versão digital): 978-85-352-8803-2

Copidesque: Augusto Coutinho
Revisão tipográfica: Hugo de Lima Corrêa
Editoração Eletrônica: Thomson Digital

Elsevier Editora Ltda.
Conhecimento sem Fronteiras

Rua da Assembleia, 100 – 6° andar
20011-904 – Centro – Rio de Janeiro – RJ

Rua Quintana, 753 – 8° andar
04569-011 – Brooklin – São Paulo – SP

Serviço de Atendimento ao Cliente
0800 026 53 40
atendimento1@elsevier.com

Consulte nosso catálogo completo, os últimos lançamentos e os serviços exclusivos no site www.elsevier.com.br.

Nota

Muito zelo e técnica foram empregados na edição desta obra. No entanto, podem ocorrer erros de digitação, impressão ou dúvida conceitual. Em qualquer das hipóteses, solicitamos a comunicação ao nosso serviço de Atendimento ao Cliente para que possamos esclarecer ou encaminhar a questão.
Para todos os efeitos legais, nem a editora, nem os autores, nem os editores, nem os tradutores, nem os revisores ou colaboradores, assumem qualquer responsabilidade por qualquer efeito danoso e/ou malefício a pessoas ou propriedades envolvendo responsabilidade, negligência etc. de produtos, ou advindos de qualquer uso ou emprego de quaisquer métodos, produtos, instruções ou ideias contidos no material aqui publicado.
A Editora

CIP-BRASIL. CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO
SINDICATO NACIONAL DOS EDITORES DE LIVROS, RJ

M572
v. 1

Microbiologia industrial : bioprocessos : volume 1 / organização Bernardo Dias Ribeiro ... [et al.]. - 1. ed. - Rio de Janeiro : Elsevier, 2018.
: il. ; 24 cm.

Inclui bibliografia e índice
ISBN 978-85-352-8724-0

1. Engenharia química. I. Ribeiro, Bernardo Dias.

17-44631 CDD: 660.2
CDU: 661


CÓPIA NÃO AUTORIZADA É CRIME
ABDR
ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE DIREITOS REPROGRÁFICOS
RESPEITE O DIREITO AUTORAL

Dedicatórias

Aos alunos... para que trilhem o belo caminho no microcosmo que inunda nossos dias com a maravilha de imagens, aromas e sabores.

Os Organizadores

Bernardo Dias Ribeiro (Capítulo 7)
Mestre em Tecnologia dos Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro
Doutor em Tecnologia dos Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro
Professor Adjunto da Universidade Estadual do Rio de Janeiro

Maria Alice Zarur Coelho (Capítulos 8 e 15**)**
Mestre em Tecnologia de Processos Bioquímicos pela Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro
Doutora em Engenharia Química, COPPE, Universidade Federal do Rio de Janeiro
Professora Titular da Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Karen Signori Pereira
Doutora em Ciência dos Alimentos, UNICAMP
Professora Adjunta da UFRJ

Rodrigo Pires do Nascimento (Capítulos 1, 2 e 9**)**
Bacharel em Microbiologia
Mestre em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro
Doutor em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro
Professor Associado da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Os Autores

A

Alane Beatriz Vermelho (Capítulo 9)
Dsc em Ciências (Microbiologia) Professor associado BIOINOVAR-Laboratórios de Biotecnologia, Unidade de Biocatálise, Bioprodutos e Bioenergia Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ

Ana Maria Mazotto de Almeida (Capítulo 9)
Doutora em Ciências Biológicas (Microbiologia) pelo IMPPG-UFRJ
Professora Adjunta do Departamento de Microbiologia Geral do Instituto de Microbiologia Prof Paulo de Góes (IMPPG) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)

Andrew Macrae (Capítulo 1)
Bachelor of Science with honours in Natural Environmental Sciences, Earth Science, University of Sheffield, England
Doctor of Philosophy (PhD) Rhizobacterial Ecology using 16S rRNA Methods, Newcastle University England

Angela Michelato Ghizelini (Capítulo 1)
Bióloga pela Universidade Federal do Paraná
Mestre em Engenharia Florestal pela Universidade Federal do Paraná
Doutora em Ciências (Biotecnologia Vegetal) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro

Ariane Gaspar Santos (Capítulo 7)
Bióloga
Mestre em Ciências de Alimentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Doutorando em Tecnologia dos Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Ângelo Samir Melim Miguel (Capítulo 11)

Doutor em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica pela Universidade de São Paulo

Professor Adjunto do Departamento de Fármacos e Medicamentos do Curso de Graduação em Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro

André Ohara (Capítulo 12)

Graduado em Biotecnologia, Universidade Federal de São Carlos

Mestre em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas

Doutorando em *Bioscience and Chemistry*, *Hokkaido University*, Japão

C

Camila Rodrigues de Carvalho (Capítulo 3)

Bacharelado em Ciências Biológicas pelo Centro Universitário de Lavras

Especialista, Mestre e Doutora em Microbiologia pela Universidade Federal de Minas Gerais

Pós-Doutoranda em Microbiologia pelo Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais

Carolina Araújo Barcelos (Capítulo 10)

Doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos pela Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Engenheira Química pela Universidade Federal de Uberlândia

Carlos Eduardo Conceição de Souza (Capítulo 7)

Bacharel em Microbiologia e Imunologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro

Mestre em Ciências (Ciência de Alimentos) - Instituto de Química - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Camila Gontijo de Morais (Capítulo 4)

Bióloga
Mestre em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais
Doutoranda em Ciências (Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais

Carlos Augusto Rosa (Capítulo 4)
Mestre em Ciências (Microbiologia), Universidade Federal de Minas Gerais
Doutor em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro
Professor Titular da Universidade Federal do Rio de Janeiro

D

Denise Mara Soares Bazzolli (Capítulo 6)
Graduação em Nutrição pela Universidade Federal de Ouro Preto
Mestre e Doutora em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa
Pós-Doutorado pela *Imperial College London*
Professora Associada do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa

Diogo de Azevedo Jurelevicius (Capítulo 2)
Biólogo
Mestre em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro
Doutor em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro
Professor Adjunto A da Universidade Federal do Rio de Janeiro

E

Erika Peçanha Santoro (Capítulo 1)
Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)
Mestre em Ciências (Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro

Eduardo Jacob-Lopes (Capítulo 5)

Doutor em Engenharia Química pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Professor Associado do Departamento de Tecnologia e Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

G

Gislaine Aparecida Vitoreli (Capítulo 3)
Bacharelado em Administração Pública pela Universidade Estadual Paulista
Bacharelado em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Minas Gerais
Mestre em Engenharia de Produção pela Universidade de São Paulo

Graciéle Cunha Alves de Menezes (Capítulo 3)
Bacharelado em Ciências Biológicas e Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal do Pampa
Doutoranda em Microbiologia pelo Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais

Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana (Capítulo 15)
Mestre em Tecnologia dos Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro
Doutora em Tecnologia dos Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro
Professora Adjunto IV da Universidade Estadual do Rio de Janeiro

Gabriela Alves Macedo (Capítulo 12)
Engenheira de Alimentos
Mestre em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas
Doutora em Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas
Professora Adjunta na Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas

J

Jéssica Catarine Silva de Assis (Capítulo 3)
Graduanda em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Minas Gerais

Johanna Méndez Arias (Capítulo 10)
Doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos pela Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro
Mestre em Metrologia pelo Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia
Engenheira Química pela Universidade Nacional da Costa Rica

José Roberto de Assis Ribeiro (Capítulo 1)
Bacharel em Ciências Biológicas, Instituto de Biologia Universidade do Estado do Rio de Janeiro UERJ
Mestre em Ciências (Biotecnologia Vegetal e Bioprocessos) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro
Doutor em Ciências do Solo, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

José Gregório Cabrera Gomez (Capítulo 14)
Mestre em Biotecnologia, Universidade de São Paulo
Doutor em Ciências (Microbiologia), Universidade de São Paulo
Professor da Universidade de São Paulo

K

Kelly Alencar Silva (Capítulo 15)
Bacharelado em Nutrição pela UNIRIO
Doutora em Ciências de Alimento pelo IQ/UFRJ
Pós-Doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos pela EQ/UFRJ
Professor Auxiliar do Departamento de Nutrição da UVA-RJ

L

Luiz Felipe Amarante Modesto (Capítulo 10)
Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos pela Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro
Engenheiro Químico pela Universidade Federal do Rio de Janeiro

Luiz Henrique Rosa (Capítulo 3)
Biólogo
Mestre em Ciências Biológicas (Microbiologia com ênfase em Micologia), Universidade Federal de Minas Gerais
Doutor em Ciências Biológicas (Microbiologia com ênfase em Micologia), Universidade Federal de Minas Gerais
Professor Associado II do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais

Leila Queiroz Zepka (Capítulo 5)
Doutora em Ciência de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Professora Associada do Departamento de Tecnologia e Ciência de Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

M

Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto (Capítulo 10)
Doutora em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos pela Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro
Mestre em Tecnologia de Processos Bioquímicos pela Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro
Engenheira Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro

Maria Isabel Queiroz (Capítulo 5)
Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas (UFPel)
Professora Titular da Escola de Química e Alimentos da Universidade Federal de Rio Grande (FURG)

Maria Cristina Pinheiro Pereira Reis Mansur (Capítulo 9)
Farmacêutica
Mestre em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio de Janeiro
Doutoranda em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Mateus Gomes de Godoy (Capítulo 9)
Bacharel em Microbiologia e Imunologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro
Mestre em Ciências de Alimentos, Universidade Federal do Rio de Janeiro
Doutor em Bioquímica, Universidade Federal do Rio de Janeiro
Professor Adjunto A, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Mariana Rocha Lopes (Capítulo 4)
Mestre em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Viçosa
Doutoranda em Microbiologia, Universidade Federal de Minas Gerais

N

Nei Pereira Junior (Capítulos 8 e 10**)**
Professor Emérito da Universidade Federal do Rio de Janeiro
PhD em Biotecnologia pela Universidade de Manchester (Inglaterra)
Mestre em Tecnologia de Processos Bioquímicos pela Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro
Engenheiro Químico pela Universidade Federal do Rio de Janeiro

P

Pedro Henrique Freitas Pereira (Capítulo 1)
Bacharel em Ciências Biológicas: Microbiologia e Imunologia pela Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ)
Mestre em Ciências (Biotecnologia Vegetal) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro
Doutor em Ciências (Biotecnologia Vegetal) pela Universidade Federal do Rio de Janeiro

Priscilla Filomena Fonseca Amaral (Capítulos 8 e 13**)**
Mestre em Tecnologia dos Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro
Doutora em Tecnologia dos Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Professora Adjunta da Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro

R

Raphael Hermano Santos Diniz (Capítulo 6)

Docente da área de Ciências Biológicas, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Minas Gerais (IFMG) - Campus Ouro Preto

Renata Estebanez Vollú (Capítulo 2)

Mestre em Biotecnologia Vegetal, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Doutor em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Pos-Doutoranda em Genética Microbiana, Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rosalie Reed Rodrigues Coelho (Capítulo 2)

Mestre em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Doutor em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro

Professora Associada aposentada da Universidade Federal do Rio de Janeiro

S

Selma Soares de Oliveira (Capítulos 1 e 9**)**

Bióloga e Licenciada em Ciências pela Universidade Gama Filho

Mestre em Ciências (Microbiologia) pela UFRJ

Doutora em Ciências (Microbiologia) pela UFRJ (Doutorado Sanduíche Public Health Research Institute - USA).

Soraya Sander Amorim (Capítulo 3)

Bacharelado em Ciências Biológicas e Mestre em Biotecnologia pela Universidade Federal de Ouro Preto

Doutoranda em Microbiologia pelo Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais

T

Tatiana Maria de Souza-Moreira (Capítulo 6)
Graduação em Farmácia e Bioquímica UNESP-Araraquara-SP
Doutora e Mestre em Ciências Farmacêuticas pela UNESP-Araraquara-SP
Pós-Doutoranda, Instituto de Química UNESP-Araraquara-SP

Tatiana Felix Ferreira (Capítulo 13)
Química pela Universidade Federal do Rio de Janeiro
Mestre e Doutora em Ciências pelo programa de Tecnologia em Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Federal do Rio de Janeiro
Professora Adjunta do Departamento de Processos Orgânicos da Escola de Química da Universidade Federal do Rio de Janeiro

Tatiana Souza Porto (Capítulo 11)
Doutora em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica pela Universidade de São Paulo Mestre em Tecnologia Bioquímico-Farmacêutica pela Universidade de São Paulo
Professora Adjunta do Curso de Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal Rural de Pernambuco

V

Vívian Nicolau Gonçalves (Capítulo 3)
Licenciada em Ciências Biológicas, Mestre e Doutora em Microbiologia pela Universidade Federal de Minas Gerais
Pós-Doutoranda em Microbiologia pelo Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Minas Gerais

Verônica da Silva Cardoso (Capítulo 9)
Pós-Doutora em Microbiologia Geral, Instituto de Microbiologia Paulo de Góes -Universidade Federal do Rio de Janeiro
Doutora em Ciências Veterinárias, Sanidade Animal - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Mestre em Microbiologia Veterinária, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Médica Veterinária bacharel pela Universidade Federal Fluminense

W

Wendel Batista da Silveira (Capítulo 6)

Graduação em Tecnologia de Laticínios pela Universidade Federal de Viçosa

Mestre e Doutor em Microbiologia Agrícola pela Universidade Federal de Viçosa

Pós-Doutorado em Engenharia Metabólica pela *Chalmers University of Technology*

Professor Adjunto do Departamento de Microbiologia da Universidade Federal de Viçosa

Luiza Nathalia de Carvalho

Autora das figuras 3.2, 3.3, 3.4 e 3.5. Bacharelado em Cinema de Animação e Artes Digitais pela Universidade Federal de Minas Gerais

Prefácio

Em um mundo invisível aos nossos olhos humanos, surgem os principais atores desse livro: nossos microrganismos! Àqueles agentes que independente do seu tamanho, forma, cor ou odor, recheiam nosso cotidiano de coisas maravilhosas. Nesse livro sobre os Bioprocessos, o leitor será conduzido pelo caminho da Bioprospecção e da Taxonomia desses pequenos seres. Ao longo de alguns capítulos será exposto às características de cada classe microbiana e como essas se assemelham e se diferenciam entre si: bactérias, fungos unicelulares e filamentosos, agentes fotossintetizantes como microalgas e cianobactérias.

Em um primeiro momento, esses minúsculos agentes são lembrados por causa das doenças ou dos alimentos estragados. Afinal muito se fala sobre epidemias e doenças, mas estes seres são essenciais em nossa vida. Temos dez vezes mais células de microrganismos em nosso corpo do que nossas próprias células e não conseguimos sobreviver sem eles.

Uma característica comum a todos os tipos de microrganismos é sua resistência. Todos são extremamente difíceis de morrer, conseguindo sobreviver em ambientes inóspitos e sem água por muito tempo, resistindo a altas e baixas temperaturas e vivendo em diversos *habitats* mundo afora. Por isso, os métodos de esterilização e desinfecção são tão importantes.

Em um mundo onde tudo se altera a uma velocidade impressionante, as mutações dirigidas pela engenharia genética são cada vez mais comuns. Produzimos agentes mais resistentes, mais produtivos e mais belos, com pigmentos que mais lembram as cores do arco-íris. Tudo isso para domesticá-los em um biorreator e obtermos enzimas, biocombustíveis, vitaminas, biossurfactantes, biopolímeros e biomoléculas funcionais, que são usadas no nosso cotidiano nas mais diversas indústrias.

Desse modo, essas células, que são a unidade funcional da vida, nos levam a aprender mais sobre nós mesmos. Afinal, estruturando a matéria, também dentro de si o ser humano se estrutura.

Maria Alice Zarur Coelho

Apresentação

O livro intitulado Microbiologia Industrial: Bioprocessos tem como objetivo fornecer aos alunos das áreas afins fundamentos para a compreensão desses bioprocessos desde o agente microbiano até alguns produtos que são obtidos em escala industrial. Este livro vem dividido em 15 capítulos nos quais é possível encontrar uma primeira parte que aborda o isolamento desses pequenos seres presentes em *habitats* diversos e como podemos classificá-los taxonomicamente. As características morfológicas e fisiológicas que os levam a serem usados como agentes produtores são encontradas em quatro capítulos divididos em bactérias, leveduras, fungos filamentosos, microalgas e cianobactérias, assim como a relevância que a engenharia genética tem no desenvolvimento desses sistemas.

Uma introdução aos fundamentos dos bioprocessos envolvendo etapas de preparo da matéria- -prima, esterilização, fermentação e separação acompanha a transição entre o estudo da célula e os processos produtivos aqui apresentados. Os bioprodutos enzimas, combustíveis, moléculas antimicrobianas e bifuncionais, vitaminas, biopolímeros e biossurfactantes foram escolhidos para compor a parte tecnológica desse livro devido à grande aplicabilidade desses nas mais diferentes indústrias.

Nesse projeto foram envolvidos cerca de 12 Instituições de Ensino Superior do país e 50 autores com reconhecida competência nos assuntos abordados. Foi mais de um ano de muito trabalho e dedicação para que esse projeto se concretizasse. Desejamos a todos uma boa leitura e muito aprendizado!

Agradecimentos

Aos autores desse livro... que aceitaram o desafio de descortinarmos esse maravilhoso mundo aos futuros engenheiros, químicos, biólogos e demais aficionados em ciência.

CAPÍTULO 1

Introdução à Microbiologia Industrial: Da Bioprospecção à Taxonomia

Andrew Macrae

Angela Michelato Ghizelini

Erika Santoro

José Roberto Ribeiro

Pedro Henrique Freitas Pereira

Rodrigo Pires do Nascimento

Selma Soares de Oliveira

Conceitos apresentados neste capítulo

Neste capítulo serão apresentadas as primeiras noções do universo da Microbiologia, desde os primórdios da origem dos seres vivos até os dias atuais. Hoje sabemos que existe uma grande e vasta biodiversidade no planeta e cada vez mais novas espécies vêm sendo identificadas, graças às diversas metodologias de que dispomos na Taxonomia Numérica e Molecular. Os micro-organismos isolados e identificados até o presente momento representam cerca de apenas 1% do total da biodiversidade microbiana estimada. Conhecer seus potenciais biotecnológicos através de estudos de bioprospecção é de grande valia para desenvolvermos novos bioprodutos e processos industriais, bem como as formas mais

adequadas para conservação e depósito em diferentes Coleções de Culturas. Para tal, é importante conhecer os aspectos legais (Lei 13.123/2015) de acesso ao Patrimônio Genético de acordo com as bases determinadas pela Convenção da Diversidade Biológica (CDB) e o Protocolo de Nagoya.

1.1. Introdução

Micro-organismo é um termo que inclui todos os seres microscópicos como bactérias, protozoários, fungos e mesmo os vírus. Apesar de um conceito superficial, essa ideia talvez tenha origem na característica ubiquitária da vida microbiana. Um estudante de microbiologia está, na maioria dos casos, familiarizado com o conceito da onipresença microbiana. Todavia, aprofundar essa perspectiva é o primeiro passo para entender a capacidade industrial microbiana. Ao observar uma superfície empoeirada, um fungo colonizando uma fruta apodrecida ou uma pessoa doente, nos lembramos do conceito nesse universo visível. Entretanto, o universo invisível é ainda mais surpreendente, pois a hegemonia da onipresença microbiana faz com que esses seres tenham o maior número absoluto, e a maior diversidade do que qualquer outro organismo no planeta. E não por acaso, além de colonizar a superfície e o interior de plantas, animais e rochas, eles também podem ser encontrados em ambientes muito extremos, como o *permafrost* ártico (Rivkina *et al.*, 2004), dentro de rochas sedimentares (Izawa, 2010) e alguns cientistas especulam até que haja vida microbiana no espaço sideral (Wickramasinghe, 2004).

Essa massa viva microbiana envolve o globo movendo as engrenagens dos ciclos geoquímicos. Consideramos os micro-organismos responsáveis pela manutenção da vida na Terra, pois eles convertem os elementos chave para a vida – Carbono, Nitrogênio, Oxigênio e Enxofre – em compostos acessíveis para as outras formas de vida (Venter *et al.*, 2004). E não apenas isso, os micro-organismos colonizando os mais variados micro-habitats da Terra se adaptaram, e através da evolução em milhões de anos desenvolveram incontáveis reações químicas de catabolismo e anabolismo para os mais diversos propósitos. Com o tempo, a humanidade aprendeu a utilizar estas capacidades prodigiosas como recurso.

O conceito da busca sistemática dos micro-organismos (ou de macro-organismos), seus compostos químicos, genes ou quaisquer dos seus produtos biológicos que tenham fins comerciais é conhecido como bioprospecção (Timmermans, 2001). A simples busca, bem como a utilização de recursos biológicos é uma antiga e ordinária prática humana, que muito se aperfeiçoou com o tempo. Desde o século XIX, por exemplo, fazendeiros sabiam, por experiência, que misturar o solo de cultivo com o solo onde plantas leguminosas foram cultivadas trazia benefícios aos campos de colheita (Bashan, 1998). E, por mais de um século, inoculantes rizobianos têm auxiliado o desenvolvimento de vegetais na agricultura,

através da fixação biológica do nitrogênio. Esses demonstram tanta eficiência, que existe atualmente uma série de formulações comerciais para vendê-los (Stephens e Rask, 2000), uma tecnologia que continua se otimizando e melhorando. No caso específico do Brasil, por exemplo, os inoculantes rizobianos para soja são tão eficientes que dispensam a necessidade de adubação química de nitrogênio.

A bioprospecção do solo por micro-organismos de interesse industrial, assim como de qualquer ambiente, exige que as estirpes escolhidas possuam um determinado conjunto de características, visando o uso industrial. Essa questão será melhor abordada no decorrer deste capítulo. Entretanto, é importante citar que mesmo as capacidades microbianas mais notórias podem ser limitadas pela tecnologia e economia vigente. Em outras palavras, os micro-organismos, mesmo que possuam o potencial biotecnológico desejado (e.g. alta produção de vitaminas), precisam também ser adaptáveis às técnicas de produção industrial. Sendo assim, o isolamento e todas as estratégias de bioprospecção, genética ou microbiana, levam em consideração não só o potencial biotecnológico desejado, mas também a viabilidade de execução no processo industrial.

A bioprospecção, como explicado anteriormente, pode envolver a busca do próprio organismo, seus metabólitos ou mesmo seus genes. Sendo assim, existem duas alternativas para se bioprospectar a diversidade microbiana: utilizar o próprio micro-organismo e seu metabolismo ou utilizar uma fração de seu código genético, para que esse expresse a característica de interesse em outro micro-organismo. É importante ressaltar que essas alternativas se comunicam e, por vezes, têm como objetivo final (produto de interesse) apenas uma parte da biotecnologia empregada. A Figura 1.1 exemplifica o conceito abordado.

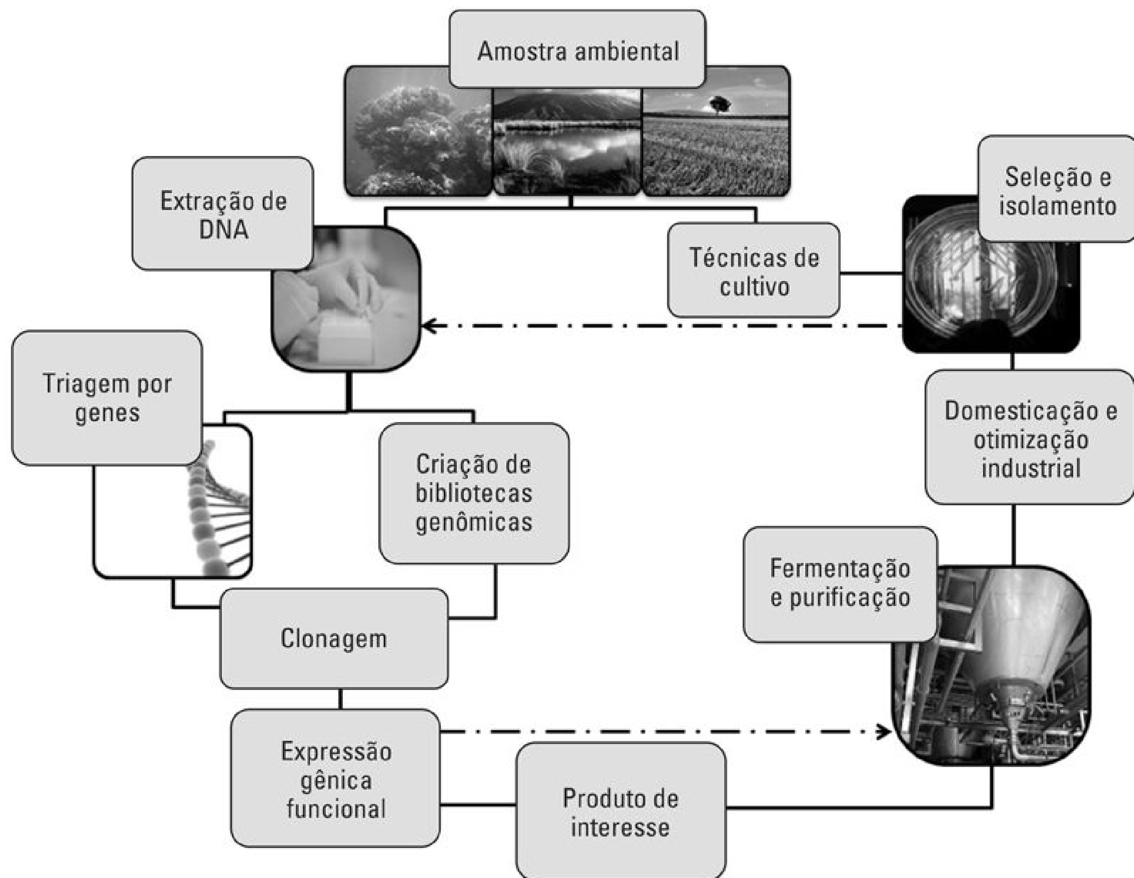


FIGURA 1.1 **Fluxograma com as perspectivas majoritárias na busca por produtos de interesse industrial.**

Como o leitor irá compreender no decorrer deste livro, existem diversas capacidades microbianas que são consideradas de interesse industrial. Não obstante, devemos lembrar que a busca de recursos genéticos e bioquímicos economicamente valiosos da natureza, em macro ou micro-organismos, exige bom gerenciamento e responsabilidade. Afinal, devemos preservar o meio ambiente para, sustentavelmente, extrairmos o seu melhor.

1.2. A origem da vida

O marco zero do questionamento científico sobre a origem da vida no planeta Terra pode ser relacionado com os experimentos do grande cientista francês Louis Pasteur, que demonstrou, em meados do século XIX, que a formação de organismos vivos a partir da matéria inanimada (hipótese da "Geração Espontânea", defendida por muitos pesquisadores e curiosos), não poderia ser viável. Após o pontapé inicial dado por Louis Pasteur e pelo fim da Geração Espontânea, os cientistas do mundo todo se voltaram então para o grande questionamento da humanidade: Como surgiu a vida no planeta? Para responder a essa pergunta, os cientistas passaram a focar nas condições especiais e específicas exigidas para o surgimento da vida, que possivelmente teriam existido apenas nos primórdios da história do planeta Terra, cerca de 4 bilhões de anos atrás.

Uma das primeiras abordagens do problema foi o questionamento acerca das características bioquímicas e estruturais dos primeiros seres vivos. Para sobreviver em um ambiente como o encontrado nos primórdios da Terra, seria necessário que esses organismos primitivos fossem capazes de utilizar fontes nutricionais simples não orgânicas (autotróficos), ou fossem capazes de metabolizar compostos orgânicos simples (heterotróficos). Atualmente, sabe-se que os micro-organismos foram de fato os primeiros seres vivos a habitarem o planeta, apresentando características básicas de sistemas vivos (Madigan *et al.*, 2010). Mas, diante do que podemos observar atualmente em termos de diversidade celular, uma pergunta precisa ser elucidada: De onde surgiram as primeiras células? Curiosamente, quando observamos a estrutura celular de todos os seres vivos, vemos uma construção similar, reforçando a hipótese de que toda a vida surgiu a partir de uma única célula, um ancestral comum, denominado LUCA (último ancestral universal comum, na sigla em inglês).

Ao longo dos 2 primeiros bilhões de anos de vida do planeta, a atmosfera terrestre era anóxica (livre de oxigênio – O_2), mas era rica em nitrogênio (N_2), dióxido de carbono (CO_2) e outros gases à base de enxofre e nitrogênio. Nessas condições, somente os organismos anaeróbicos poderiam sobreviver. Mas as células microbianas que viviam nessas condições apresentavam diferentes características fisiológicas, sendo uma dessas a metanogênese (capacidade de produzir metano a partir de CO_2). Assim, há aproximadamente 3,5 bilhões de anos, surgiam os primeiros seres fotossintéticos anaeróbicos, iniciando o processo de lenta oxigenação da atmosfera terrestre (processo que levaria 1 bilhão de anos), como

podemos ver na Figura 1.2 (Madigan *et al.*, 2010). Os primeiros seres fototróficos eram relativamente simples, como as atuais bactérias púrpuras (bactérias anaeróbicas fotossintéticas) e, a partir desses, foi possível o surgimento gradativo das cianobactérias. Conforme o nível de oxigênio na atmosfera se elevava, novas formas de vida foram evoluindo a partir das já existentes, permitindo o surgimento de seres multicelulares e eucarióticos (Madigan *et al.*, 2010).

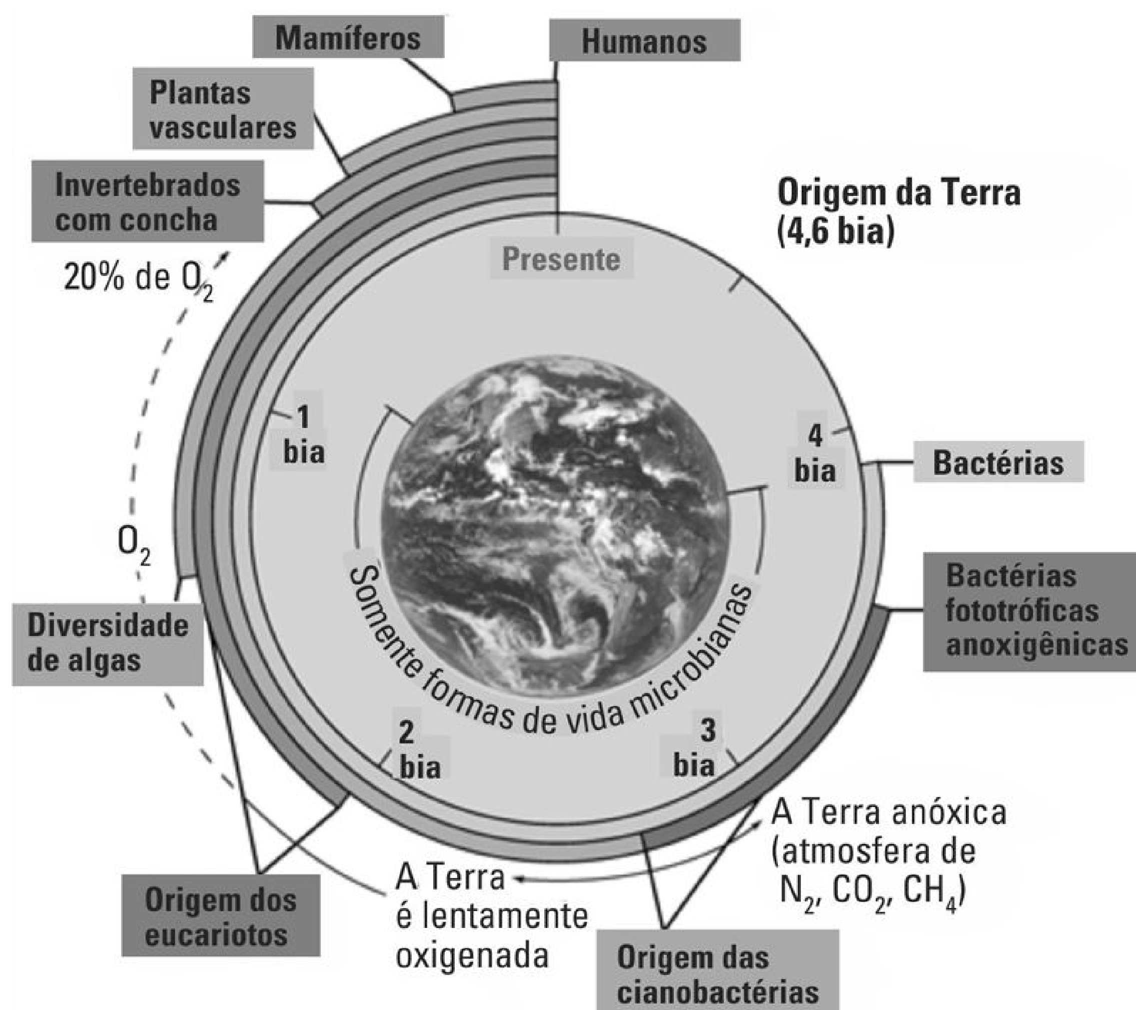


FIGURA 1.2 Resumo da origem da vida na Terra, em bilhões de anos. *Fonte:* Madigan *et al.* (2010)

Algumas hipóteses foram propostas para tentar elucidar a origem da vida celular. Uma dessas hipóteses seria a origem da vida de subsuperfície. Como a superfície terrestre há 4 bilhões de anos era muito hostil e instável, essa teoria sugere que a vida surgiu em fontes hidrotermais no leito dos

oceanos, uma vez que apresentam condições mais estáveis e menos hostis, com suprimento abundante de compostos inorgânicos, como hidrogênio (H_2) e o sulfeto de hidrogênio (H_2S). Quando essa água muito quente (90 a 100°C) e alcalina fluía pela crosta terrestre, encontrando um ambiente de águas oceânicas mais frias e ácidas, contendo ferro, formavam-se novos componentes, como a pirita coloidal, silicatos, carbonatos e argila montmorilonita rica em magnésio (Theobald, 2010; Madigan *et al.*, 2010). Esses precipitados permitiram a formação de elevações estruturadas contendo sulfetos de níquel e ferro, o que permitiu a ocorrência das reações químicas que originaram os aminoácidos, peptídeos simples, açúcares e bases nitrogenadas (Figura 1.3). A partir do fosfato presente na água do mar, surgiram outras moléculas como ATP, AMP e sua polimerização em RNA catalisada pela argila montmorilonita. O fluxo de compostos inorgânicos promoveu o suprimento constante de elétrons, permitindo assim a construção de uma força próton motiva pré-biótica. A molécula de RNA apresentava capacidade autorreplicante e também era capaz de se ligar a outras moléculas como ATP, nucleotídeos e aminoácidos, permitindo a geração de proteínas, que ao longo do processo evolutivo foram se diferenciando cada vez mais e acabaram assumindo o papel catalítico que antes pertencia ao RNA. Eventualmente, outra molécula também surgiu a partir do RNA primitivo, o DNA, mais estável para armazenar a informação genética (Madigan *et al.*, 2010).

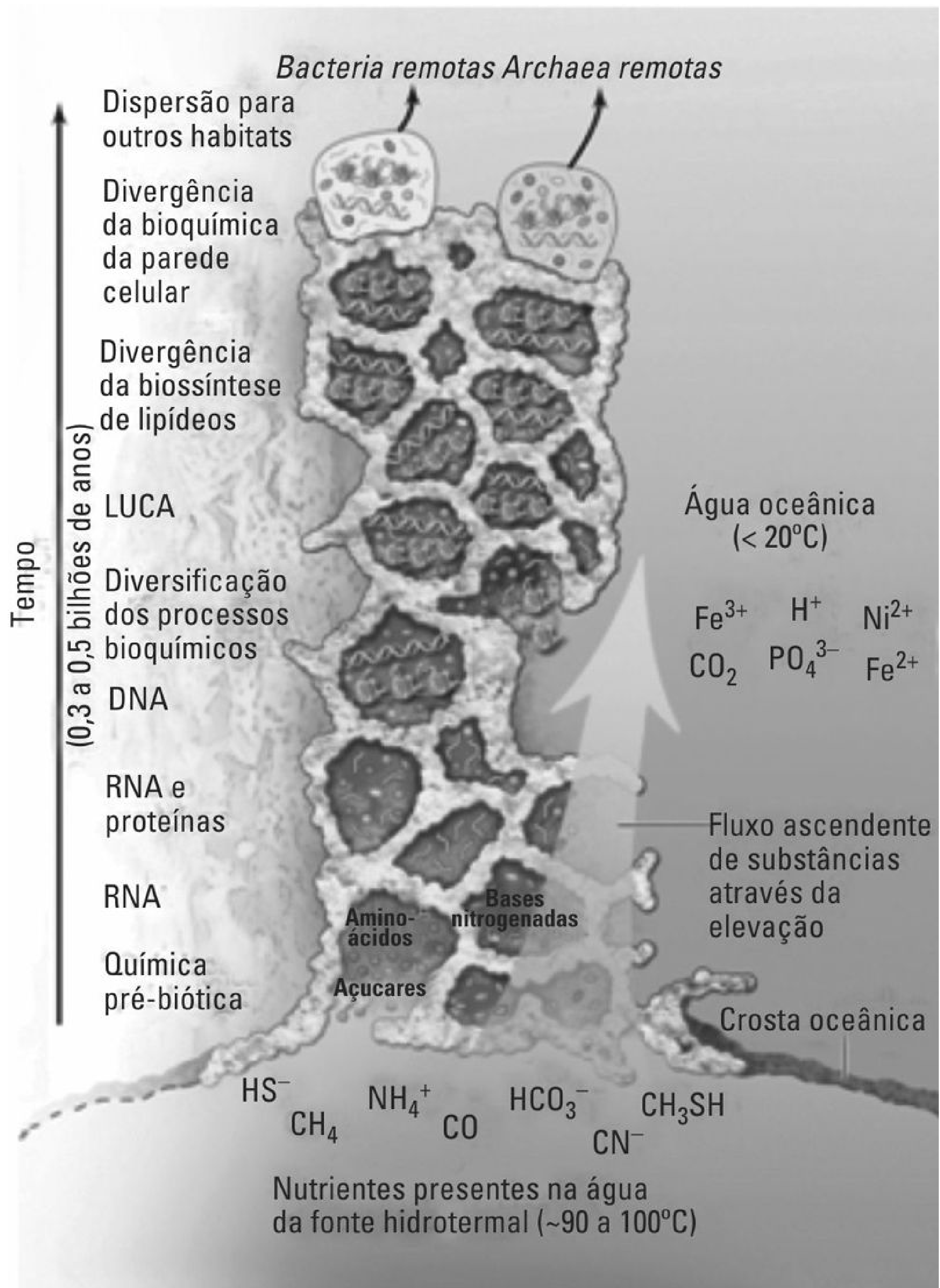


FIGURA 1.3 Modelo proposto de origem da vida celular pela teoria da subsuperfície e sua divergência em 2 procariotos distintos: Bacteria e Archaea. *Fonte:* Madigan *et al.* (2010).

Outras moléculas orgânicas que também surgiram nessas condições da Terra Primitiva e que foram de grande relevância para o surgimento das primeiras células foram os lipídeos. As proteínas produzidas durante esse processo de formação de moléculas orgânicas foram embebidas nos lipídeos, formando estruturas vesiculares com características semipermeáveis, o que permitiu o acesso de outros compostos orgânicos dentro dessas vesículas lipídicas formadas (Theobald, 2010; Madigan *et al.*, 2010). Ao aprisionarem moléculas orgânicas como DNA e RNA, criou-se então a condição básica para o surgimento da primeira célula autorreplicante. A partir de então, essa primeira célula denominada LUCA permitiu o desenvolvimento de rotas metabólicas diferenciadas na síntese de biomoléculas, separando em 2 grandes grupos de procariotos distintos as Bactérias e Archaeas. A hipótese do LUCA surgiu tendo em vista que todos os organismos compartilham o mesmo código genético (DNA e RNA), as mesmas características essenciais da replicação do genoma e da expressão de genes, as mesmas reações anabólicas básicas e a produção de energia mediada pela enzima ATPase (Lazcano *et al.*, 2007; Theobald, 2010; Madigan *et al.*, 2010).

O reconhecimento das diferenças estruturais e metabólicas que existem entre a maquinaria de transcrição e tradução do genoma em bactérias archaeas e eucariotos foi interpretado como sendo um possível resultado de refinamentos evolutivos independentes que permitiram a evolução em diferentes ramos na árvore filogenética. Acredita-se que os eucariotos surgiram inicialmente a partir da fusão de duas células procarióticas com linhas evolutivas diferentes: (i) bactéria e (ii) archaea. Após essa fusão, uma nova estrutura celular foi formada, mas ainda não apresentava as organelas que conhecemos hoje. Um dos avanços cruciais para a evolução das células eucarióticas primitivas foi a associação com uma alfa-proteobactéria, a qual passou a fornecer gradativamente a energia necessária para a sobrevivência dessa estrutura celular e que, posteriormente, veio a se tornar a organela mitocôndria. Essa associação é conhecida como Teoria da Endossimbiose (Figura 1.4). Essa teoria foi inicialmente proposta por Lynn Margullis, a qual sugere que as células eucarióticas surgiram como comunidades de organismos interagindo entre si, os quais se uniram numa ordem específica, gerando novas células. A proposta é que os elementos procarióticos (atuais mitocôndria e cloroplasto) poderiam ter sido incorporados em uma célula eucariótica hospedeira e, com o tempo, desenvolvido uma interação biológica positiva, permitindo então o estabelecimento de uma simbiose obrigatória (Wikipedia, acessado em 15 de dezembro de 2015). Desta forma, foi possível a evolução de diferentes rotas metabólicas tanto em procariotos

como em eucariotos, permitindo a geração de milhões de espécies com características específicas dentro dos 3 domínios que se reconhece hoje: (i) Bacteria; (ii) Archaea; e (iii) Eukarya. Até hoje, novas espécies vêm sendo isoladas e descritas, graças a cada vez mais avanços tecnológicos no desenvolvimento de técnicas moleculares que utilizam regiões conservadas do DNA para análises cada vez mais específicas. A identificação das espécies dos organismos vivos é estudada dentro de um ramo da biologia denominado Taxonomia, como descrito no item 1.3.

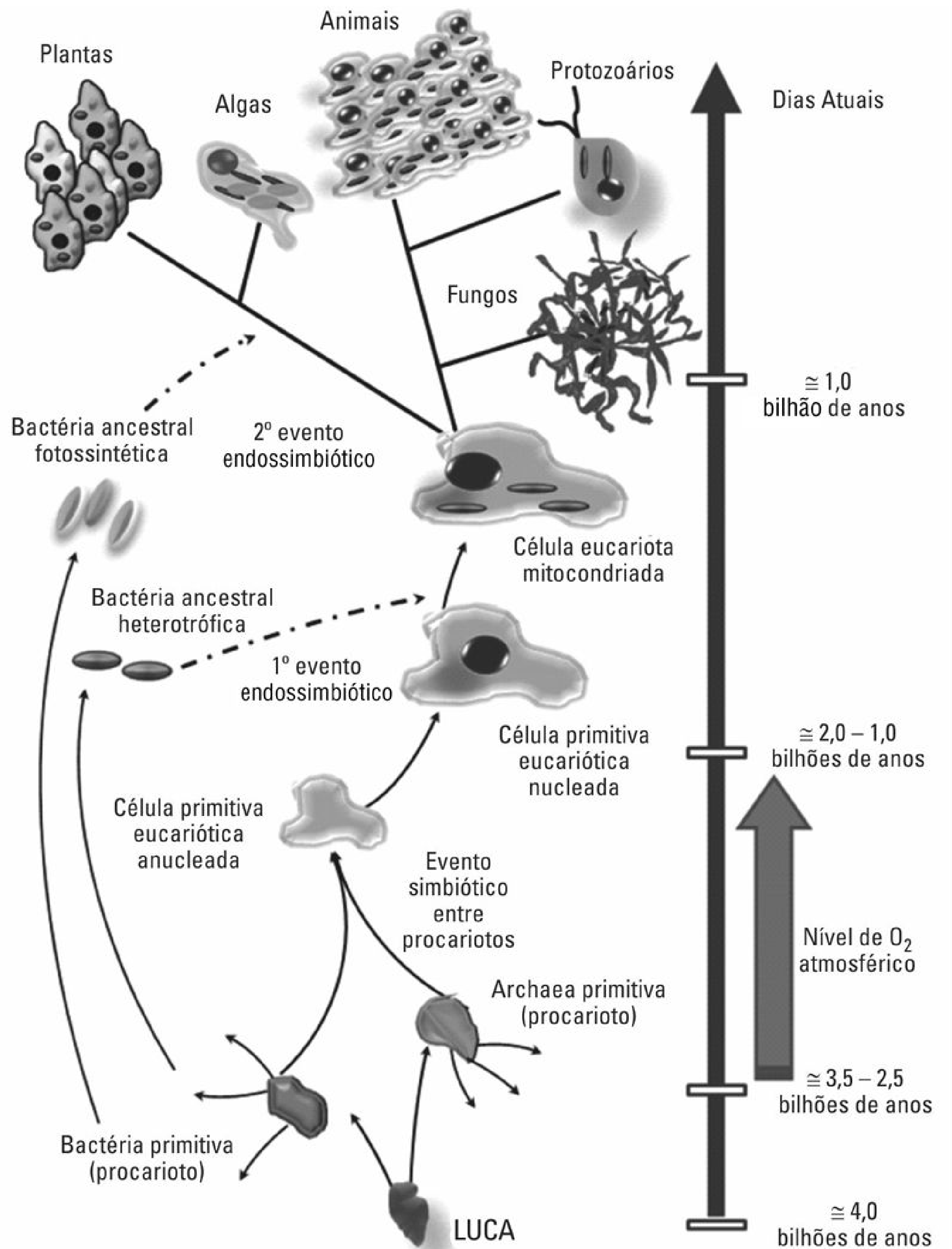


FIGURA 1.4 **Proposta da Teoria da Endossimbiose e evolução da vida no Planeta Terra**

1.3. Taxonomia microbiana

O campo da ciência responsável por classificar e descrever os seres vivos é a taxonomia. A informação taxonômica permite que os cientistas compreendam a biodiversidade e as relações entre os organismos vivos presentes em diferentes ecossistemas. Uma classificação é uma hipótese, e todo agrupamento proposto é hipotético, que pode ser modificada à luz de novas informações sobre o organismo ou sobre seu agrupamento (Hawksworth, 2004). Para a microbiologia, a taxonomia desempenha um importante papel ao permitir a identificação correta das estirpes de micro-organismos a partir de amostras clínicas e ambientais (Ramasamy *et al.*, 2014).

A história da taxonomia teve início por volta de 330 a.C. com o interesse de Aristóteles e Teofrasto pela classificação. Mas um sistema organizado e estruturado de classificação dos seres vivos foi desenvolvido somente no século XVIII por Carl Linnaeus (1707-1778), quando publicou "*Sistema Naturae*" (1735). Linnaeus estabeleceu um sistema binomial de nomenclatura que continua sendo utilizado até hoje. Porém, a classificação de Linnaeus não incluía os micro-organismos, que apesar de terem sido descobertos em 1674 por Antony van Leeuwenhoek (1632-1723), somente foram compreendidos no século XIX, principalmente a partir dos estudos de Louis Pasteur (1822-1895) e Robert Kock (1843-1910) sobre a importância industrial e medicinal dos micro-organismos. É, portanto, a partir do século XIX que a microbiologia se estabelece como um campo da ciência e os microbiologistas passam a utilizar a nomenclatura binomial de Linnaeus para designar as espécies microbianas.

Com Charles Darwin (1809-1882), a história da taxonomia sofre uma grande mudança. Em *A origem das espécies* (1859), Darwin publica suas ideias sobre a classificação dos seres vivos baseada em genealogia (origem comum) e em grau de semelhança (quantidade de mudança evolutiva), dando origem a um sistema de classificação evolutivo. Em 1965, com o sequenciamento de proteínas e mais tarde do DNA, Emile Zuckerkandl (1922-2013) e Linus Pauling (1901- -1994) sugerem que a melhor forma de classificar os seres vivos seria através de macromoléculas, como o DNA. Mas foi em 1990, que Carl Woese e colaboradores propuseram um sistema de classificação genealógico, como previsto por Darwin, que incluía todas as formas de vida. Eles também sugeriram uma nova árvore da vida baseada em relações filogenéticas, na qual os cinco reinos criados pós-

Linnaeus, foram reduzidos a três Domínios: Archaea, Bacteria e Eukarya (Figura 1.5).

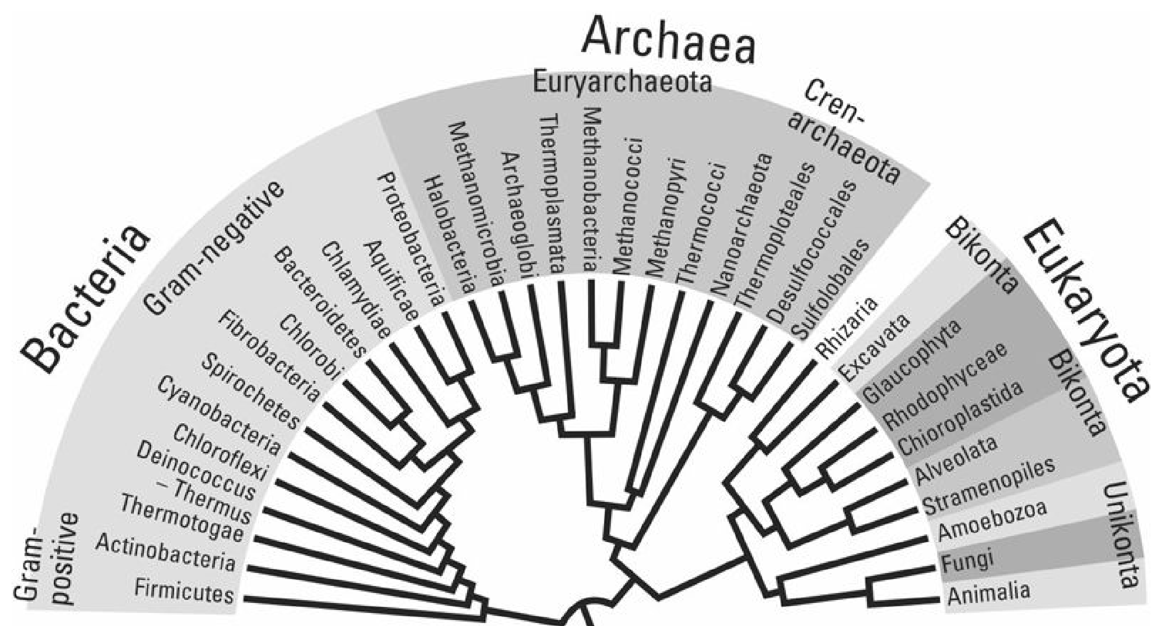


FIGURA 1.5 Árvore filogenética mostrando os três domínios: Bacteria, Archaea e Eukarya (ou Eukaryota). *Fonte:* Wikimedia Common (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Phylogenetic_Tree_of_Life.png).

Até hoje, persistem muitas controvérsias sobre como classificar os seres vivos. A classificação de Linnaeus ainda é utilizada e bastante útil, no entanto, a ausência de caracteres morfológicos para explicar as diferenças entre tantas espécies distintas dificulta a classificação de muitos micro-organismos, como fungos e bactérias. Por isso, para os micro-organismos, a “sistemática molecular evolucionista” sugerida por Woese é amplamente aceita, mesmo que a definição de novos *taxa* necessite de caracteres fenotípicos. Ou seja, a taxonomia atual combina da melhor forma a classificação fenotípica e genealógica na tentativa de melhor organizar e classificar.

A unidade básica da taxonomia é a espécie, onde também se cruzam várias áreas da biologia, como ecologia, genética populacional, genômica e evolução. A definição de espécie foi a maneira que os cientistas encontraram para circunscrever essa unidade taxonômica e que está baseada em diferentes parâmetros que irão permitir a identificação de um organismo. Esses parâmetros variam de acordo com os organismos estudados, ou seja, os parâmetros utilizados para definir fungos podem não ser os mesmos utilizados para definir procariotos, já que eles apresentam

características distintas, assim como histórias evolutivas diferentes (Rosselló-Móra e Amann, 2015). Por exemplo, a capacidade de bactérias em trocar genes dentro e entre espécies é chamada de transferência horizontal de genes (THG) e é uma característica muito importante no desenvolvimento de espécies procariotas e, ao mesmo tempo, dificulta esse delineamento de espécie (Lawrence, 2002). A THG, embora presente em outros grupos, é muito mais comum em organismos procariotos.

A identificação correta de um organismo pode responder diversas questões em relação às características ecológicas, fisiológicas, bioquímicas e evolutivas. Além disso, a demarcação clara entre espécies é importante em várias aplicações, como regras de quarentena, na indústria farmacêutica, para pedidos de patentes, produção de biofertilizantes e inoculantes, entre outros. Porém, para os microbiologistas é bastante complexo integrar essas diversas fontes de informação na ausência de um conceito de espécie amplamente aceito quando comparado com o conceito biológico de espécie proposto por Ernst Mayr (1904-2005). Embora o status de uma espécie seja difícil de justificar do ponto de vista conceitual, essa catalogação tem um papel vital na área clínica e de saúde pública, na biotecnologia, na agricultura e na biossegurança.

De acordo com o conceito biológico de espécie, a existência de muitas espécies de animais e plantas é assegurada por forças evolutivas coesas que resultam em barreiras à recombinação entre elas (1942-2008). Essas forças evolutivas coesas também são necessárias para gerar espécies microbianas, já que a ausência de um acúmulo de variação genética provavelmente resultaria em uma genética contínua. Porém, os procariontes são assexuais e não formam espécies utilizando esse percurso genético, assim como acontece com alguns fungos.

Tradicionalmente, os micro-organismos são classificados baseados em morfologia e bioquímica. Há aproximadamente 300 anos, os caracteres morfológicos são utilizados para identificar, classificar e interpretar a filogenia dos seres vivos. Esses caracteres contribuem significativamente na identificação de espécies, como é evidente a partir de uma infinidade de chaves de identificação e descrições morfológicas. Porém, o conceito morfológico de espécie está bastante desatualizado, já que considera apenas os aspectos morfológicos do espécime, e a identificação a partir desses caracteres pode não refletir relações filogenéticas (Shenoy *et al.*, 2007), como pode ser visto no complexo de espécies *Aspergillus niger*, que contém nove táxons morfologicamente indistinguíveis (*A. niger, A. tubingensis, A. acidus, A. brasiliensis, A. costaricaensis, A. lacticoffeatus, A. piperis, A. vadensis* e *A. awamori*) (Perrone *et al.*, 2011).

O conceito filogenético de espécie, que utiliza caracteres moleculares, supera algumas limitações relacionadas com o conceito biológico de espécie, e outros conceitos, e facilita a identificação e classificação dos organismos (Shenoy *et al.,* 2007). O desenvolvimento de ferramentas de biologia molecular para descrever a diversidade tem permitido uma abordagem mais simples, rápida e prática no estudo das comunidades microbianas. Essas técnicas possibilitam a identificação de espécies baseada em sequências de DNA (Taylor, 2008) e permitem analisar as relações filogenéticas entre grupos, estabelecer conexões entre formas de espécies (formas sexuadas e assexuadas), testar hipóteses taxonômicas em diferentes estratos da classificação e determinar relações com organismos não cultiváveis (Shenoy *et al.,* 2007). No entanto, o conceito filogenético de espécie também tem limitações, já que definir a distância necessária para a separação de espécies é bastante subjetivo. Este nível de corte não é baseado em argumentos teóricos, mas foram escolhidos empiricamente há mais de 20 anos, porque coincidiam com as definições pré-existentes de espécie (Achtman e Wagner, 2008).

A taxonomia bacteriana teve início no final do século XIX. Inicialmente, as bactérias eram classificadas com base em marcadores fenotípicos básicos, como morfologia, requisitos de crescimento ou potencial patogênico, e, mais tarde, propriedades fisiológicas e bioquímicas foram acrescentadas para esta finalidade. Os métodos fenotípicos aplicados à taxonomia de procariotos incluem uma grande variedade de técnicas, cujo objetivo é descrever características morfológicas, coloração, propriedades antigênicas, composição química da parede celular e da membrana externa, potencial metabólico, composição de proteína, patogenicidade e habitat (Ramasamy *et al.,* 2014). Entre os anos de 1960 e 1980, foram utilizadas a quimiotaxonomia, a taxonomia numérica e técnicas de hibridização DNA-DNA. Na década de 1980, o desenvolvimento de técnicas de amplificação e sequenciamento de DNA, principalmente do gene 16S do rRNA, elucidou alguns pontos e facilitou a classificação bacteriana. Entre os critérios genotípicos, hibridação de DNA-DNA (HDD), teor de G + C do DNA e análise de sequências do gene 16S rRNA são métodos amplamente utilizados em taxonomia de procariotos (Tindall *et al.*, 2010; Ramasamy *et al.,* 2014). Espécies procariotas, desde os anos 1970, são caracterizadas genotipicamente pela determinação de semelhanças genéticas entre isolados, avaliada pelo grau de hibridização de seus genomas sob condições padronizadas (hibridização DNA-DNA ou HDD). A similaridade compartilhada entre os conteúdos de nucleotídeos e genes contribui para uma medida de parentesco dos genomas, e valores de similaridade menores ou iguais a 70% indicam que os dois espécimes

testados pertencem a espécies distintas (Gevers *et al*., 2005; Ramasamy *et al*., 2014). Antes da disponibilidade da informação pelo sequenciamento de DNA, HDD era o método padronizado para identificar e classificar procariotos na ausência de caracteres morfológicos ou fenotípicos (Gevers *et al*., 2005). A HDD tem sérias limitações: é um procedimento demorado, complexo, não permite a rápida identificação de procariotos, não é possível realizar a identificação de organismos não cultiváveis e, principalmente, não permite a identificação de estirpes individuais utilizando banco de dados, já que exige a comparação de dois genomas (Gevers *et al*., 2005). Mais tarde, os avanços nas técnicas de sequenciamento permitiram a utilização da análise de sequências de DNA como fonte de informação indispensável na busca da diversidade de micro-organismos em diversas escalas e localizações no tempo e no espaço (Nilsson *et al*., 2010). O método de similaridade de sequências do gene RNA ribossomal (rRNA) permite a classificação dos procariontes utilizando uma característica distribuída de forma universal, e a classificação é possível através da utilização de bancos de dados de sequências.

Estudos sobre diversidade microbiana têm equiparado espécies de bactérias e archaeas com unidades taxonômicas operacionais (OTUs) baseadas em sequências do gene 16S rRNA, uma molécula onipresente em genomas bacterianos e de archaeas (Olsen e Woese, 1993; Achtman e Wagner, 2008; Medini *et al*., 2008). O gene 16S rRNA é um marcador molecular eficaz para fins taxonômicos porque é um gene universal, funcionalmente estável, altamente conservado e pouco sujeito a transferência horizontal de genes (Ramasamy *et al*., 2014). O gene 16S rRNA também apresenta alta correlação de similaridade com a hibridização DNA-DNA, cerca de 70% de ligação DNA-DNA corresponde a uma identidade de 98% da sequência do gene 16S rRNA. A recomendação para construir uma genealogia adequada baseada no gene 16S rRNA para fins taxonômicos é utilizar sequências alinhadas, de alta qualidade e quase completas do gene 16S rRNA. Todas as sequências da estirpe tipo relevante devem ser incluídas e a filogenia deve ser reconstruída por meio de diferentes algoritmos (geralmente máxima verossimilhança, máxima parcimônia e *neighbor-joining*), com a aplicação de diferentes filtros conservacionistas e diferentes conjuntos de dados, que podem incluir estirpes comuns presentes nos bancos de dados. O resultado da reconstrução filogenética pode ser uma árvore de consenso baseada em observações diferentes ou uma árvore selecionada a partir de valores de *probabilidade (bootstrap)* que indicam a instabilidade dos ramos (Rosselló-Morá e Amann, 2015).

No entanto, o gene 16S do rRNA também apresenta algumas limitações como um marcador taxonômico, como, por exemplo, o elevado grau de conservação em alguns gêneros, como no gênero *Brucella*; a presença de variações de nucleotídeos entre vários *operons* do rRNA em um genoma; e, ocasionalmente, pode ocorrer transferência lateral e recombinação genética, que podem não refletir a filogenia procariótica com precisão.

O conteúdo de G + C presente no DNA de procariotos é muitas vezes utilizado para fins de classificação, como no caso do filo Actinobacteria, conhecido por apresentar bactérias Gram-positivas com altos conteúdos de G + C, e o filo Firmicutes, com bactérias Gram-positivas com baixos conteúdos de G + C, e, embora seja variável intragenomicamente, devido à transferência horizontal de genes (diferenças de 0,5 e 0,10% entre as estirpes), são utilizadas para classificar espécies ou gêneros distintos, respectivamente. No entanto, esses valores não são aplicáveis a todos os gêneros de bactérias, como espécies do gênero *Rickettsia*, por exemplo (Ramasamy *et al*., 2014).

A partir dos anos 1990, o sequenciamento do genoma inteiro produziu uma revolução na taxonomia microbiana, propiciando o acesso à informação genética de uma estirpe. Apesar deste enorme progresso e dos vários métodos baseados no genoma que foram desenvolvidos e propostos para fins taxonômicos, incluindo a análise da sequência multilocus (MLSA) e identidade média de nucleotídeos (ANI), a análise do genoma inteiro não é aceita como uma fonte de informação taxonômica (Ramasamy *et al*., 2014; Rosselló-Móra e Amann, 2015).

Atualmente, as espécies microbianas são definidas por uma abordagem polifásica baseada em propriedades fenotípicas, genotípicas e quimiotaxonômicas, ou seja, abordagens polifásicas em pesquisas taxonômicas somam as técnicas moleculares à investigação tradicional (morfologia, bioquímica) (Gevers *et al*., 2005; Achtman e Wagner 2008Tindall *et al*., 2010; Ramasamy *et al*., 2014). Na taxonomia polifásica, os microbiologistas têm como objetivo chegar a uma classificação de consenso, integrando diferentes tipos de dados e informações em uma classificação que apresenta o mínimo de contradições. Isto inclui dados fenotípicos, genotípicos e informações filogenéticas. Para uma classificação exata de uma espécie, três grandes premissas devem ser atendidas: monofilia, coerência genômica e coerência fenotípica (Rosello-Morá e Amman, 2015). O monofiletismo é uma premissa absoluta que garante que todos os organismos filiados ao conceito apresentam uma história evolutiva comum, ou seja, um grupo monofilético é um agrupamento de organismos descendentes de um ancestral comum (Rosello-Morá e Amman, 2015). Coerência genômica pode ser definida como um elevado grau de

semelhança no conteúdo genético e na sequência de genes correspondentes dentro da espécie (Doolittle e Papke, 2006). Coerência fenotípica é o compartilhamento de características fisiológicas, estruturais e ecológicas por organismos que pertencem a um mesmo táxon de forma que eles possam ser considerados uma unidade taxonômica única (Roselló-Morá e Amann, 2015).

A abordagem polifásica também apresenta alguns desafios a serem superados em relação ao nível de corte para os níveis genômicos que separa os táxons (Achtman e Wagner, 2008). Este desafio envolve o sequenciamento de genes ou regiões do DNA referentes à determinação do corte apropriado das divergências, na comparação de sequências, para definir as unidades taxonômicas operacionais (OTUs) que correspondem a espécies reconhecidas. Atualmente, a partir de dados de sequenciamento de alto rendimento, o corte de similaridade entre sequências foi determinado em 99% para a identidade no nível de espécie (Medini *et al*., 2008).

Baseado nos mais recentes avanços tecnológicos, como métodos de sequenciamento de alto rendimento, Roselló-Morá e Aman (2015) sugeriram um novo conceito de espécie para Bacteria e Archaea em que uma espécie é "uma categoria que circunscreve monofileticamente, geneticamente e fenotipicamente populações coerentes de indivíduos que podem ser claramente discriminadas de outras entidades por meio de parâmetros padronizados". Esses parâmetros devem ser baseados em dados genéticos e fenotípicos, obtidos por métodos que possibilitam a geração de bancos de dados interativos, que, por sua vez, permitem comparações informatizadas utilizando ferramentas de bioinformática.

O primeiro genoma bacteriano (*Haemophilus influenzae* Rd) completo foi sequenciado em 1995 por Fleischmann e colaboradores utilizando o método de Sanger, uma metodologia custosa, demorada e trabalhosa em relação ao sequenciamento de genomas completos. Os métodos de sequenciamento de nova geração (NGS – *New Generation Sequencian*), como o sequenciamento Roche 454 e *Illumina*, facilitaram, baratearam e descomplicaram o sequenciamento genômico, revolucionando todo o campo da taxonomia. Esses novos métodos de sequenciamento de DNA podem gerar grandes quantidades de dados com sequências de comprimentos relativamente curtos, que são posteriormente montados gerando sequências finais (*contigs*) com alta precisão (Chun e Rainey, 2014).

A comparação de dados de sequências é utilizada para substituir HDD para fins taxonômicos (Chun e Rainey, 2014). Foram feitos muitos esforços para correlacionar os valores de HDD com índices digitais derivados de comparação computacional de duas sequências do genoma. A identidade média de nucleotídeos (ANI – *Average Nucleotide Identity*) representa uma

média dos valores de identidade entre vários conjuntos de regiões ortólogas partilhadas por dois genomas. Baseado em estudos comparativos entre valores de ANI e HDD, os valores de ANI equivalentes ao limiar de 70% de HDD são de 95-96% (Richter e Rosselló-Móra, 2009; Chun e Rainey, 2014). Ao contrário ANI, que é um índice de semelhança, Henz *et al*. (2005) desenvolveram o índice Genome Blast Distance Phylogeny (GBDP), que compara um genoma contra vários disponíveis em um banco de dados, par a par, ou seja, duas sequências genômicas são alinhadas utilizando ferramentas de alinhamento, gerando uma matriz de distância, cujos dados podem ser utilizados na construção de árvores filogenéticas.

Outra abordagem muito utilizada em taxonomia é a tipagem de sequências multilocus (MLST – *Multilocus Sequence Typing*), principalmente para separar estirpes intimamente relacionadas dentro de uma espécie. Esse método utiliza apenas partes conservadas dos genomas para a comparação filogenética de duas estirpes (Sullivan *et al*., 2005). Já a abordagem filogenética denominada análise da sequência multilocus (MLSA – *Multilocus Sequence Analysis*) é bastante utilizada e recomendada pela comissão *ad hoc* do International Committee on Systematics of Prokaryotes para a classificação e identificação de espécies bacterianas e tem sido uma alternativa à abordagem que utiliza o gene 16S rRNA e HDD. Além disso, esse método também tem sido aplicado para esclarecer a estrutura filogenética entre os filos e outras ramificações taxonômicas. A MLSA baseia-se em reconstruções filogenéticas de vários genes selecionados (Chun e Rainey, 2014; Roselló-Morá e Amann, 2015), sendo recomendado um mínimo de 5 genes para evitar problemas de ruídos filogenéticos (Stackebrandt *et al*., 2002). No geral, MLSA tem mostrado uma resolução significativamente melhor na reconstrução filogenética do que filogenias baseadas no gene 16S rRNA.

Resumindo, o que se utiliza hoje no reconhecimento de novas espécies de procariotos é uma abordagem em duas fases: o cálculo de similaridade da sequência do gene 16S rRNA e posteriormente a HDD é aplicada quando a similaridade do gene 16S rRNA é de 97%. Com o crescente aumento de sequências genômicas com nomes publicamente validados, a tendência é que a HDD seja substituída por índices de parentescos de sequências do genoma, como ANI por exemplo. Além disso, o sequenciamento do genoma também fornece o teor preciso de G + C no DNA, bastante importante em taxonomia de procariotos, como já citado anteriormente.

Na prática, a caracterização taxonômica de uma coleção de isolados começa com uma triagem que permite que os isolados mais intimamente relacionados sejam agrupados. Diversos métodos podem ser utilizados no agrupamento e separação dos espécimes, métodos quimiotaxonômicos,

bioquímicos e baseados em tipagem molecular, como amplificação via PCR com iniciadores aleatórios, análises de polimorfismo de comprimento de fragmento amplificado (AFLP – *Amplified-Fragment Length Polymorphism*). Posteriormente, com as estirpes agrupadas, representantes dos diferentes grupos são selecionados para o sequenciamento do gene 16S rRNA. Após o sequenciamento, as sequências são analisadas e comparadas com as sequências de espécies conhecidas depositadas em bancos de dados públicos, como GenBank[1] e Ribosomal Database Project [2]. A partir dos resultados desta análise, a posição filogenética dos organismos é determinada e os isolados selecionados têm de ser incluídos em experimentos de hibridização DNA-DNA.

Estudos metagenômicos através de métodos de sequenciamento de nova geração (NGS), por exemplo, têm permitido o reconhecimento de populações através da análise de sequências de DNA presentes em amostras ambientais, que podem ser consideradas pertencentes a populações individuais estreitamente relacionadas, identificadas como membros de espécies que ainda não foram descritas (Konstantinidis e Rosselló-Morá, 2015). Esses novos métodos permitem a recuperação de algumas informações sobre os organismos não cultivados, como a determinação da morfologia, da abundância, da distribuição em determinados habitats, de indicações sobre as taxas de crescimento e de atividades fisiológicas (Rosselló-Morá e Amann, 2001). Neste sentido, o International Committee on Systematic Bacteriology implementou o status provisório denominado *Candidatus* para procariotos não cultivados que apresentarem dados básicos sobre sua filogenia, morfologia, ecologia e fisiologia (Sharma *et al*., 2015; Konstantinidis e Rosselló-Morá, 2015). Como um status provisório, os taxonomistas procuram ampliar os conhecimentos sobre os *taxa Candidatus* de modo que possam isolar e caracterizar espécimes desses grupos, possibilitando assim, sua classificação definitiva.

A utilização de critérios genotípicos apresenta algumas outras limitações que ainda podem ser superadas, como por exemplo, o número crescente de genomas sequenciados permanece inclinado para micro-organismos de importância médica ou biotecnológica; as sequências do genoma completo das espécies de interesse não são sempre as de estirpes tipo; a qualidade das sequências disponíveis em bancos de dados públicos (sequências completas, montadas ou contíguas) pode ser contestada. Além disso, sequências genômicas podem ser menos informativas do que os genomas completos para fins taxonômicos, havendo, portanto, uma necessidade de definir a qualidade mínima para sequenciamento de genomas a serem incluídos nas análises taxonômicas (Ramasamy *et al*., 2014). Para um enquadramento taxonômico estável, é preciso que se conclua o

sequenciamento do genoma de todas as espécies descritas até agora, aproximadamente 12.000, classificadas como Bacteria e Archaea, já que apenas 3500 estirpes tipo têm seu genoma completo ou quase disponível (Roselló-Morá e Amann, 2015). Todos os esforços necessários para isto estão sendo feitos e espera-se que em breve um banco de dados bastante completo esteja disponível para toda a comunidade científica.Quadro 1.1

Quadro 1.1 Definições de algumas terminologias adotadas em taxonomia microbiana

Gene 16S rRNA. Componente da pequena subunidade ribossomal de procariotos, apresenta regiões hipervariáveis que se diferenciam entre as espécies, sendo, portanto, úteis para a identificação de bactérias e archaeas a nível da espécie (Medini *et al*., 2008).

OTUs (*Operational Taxonomic Units*). Unidades taxonômicas operacionais: Grupos de sequências que são significativamente separadas de outras sequências por meio de técnicas de agrupamento hierárquico (independentes de inferências filogenéticas) e utilizando rigorosos limiares de identidade de sequências (Yarza *et al*., 2014).

Quimiotaxonomia. Métodos analíticos para obtenção de informações sobre vários componentes químicos da célula, como aminoácidos, proteínas, lipídios e açúcares. É importante observar que a diferença de composição química é resultante de diferenças genéticas e não devido a variações nas condições de cultivo (Roselló-Morá e Amann, 2001).

Hibridização DNA-DNA (HDD). Abordagem que avalia a semelhança genética global entre isolados pelo grau de hibridização entre os seus genomas sob condições padronizadas. Os isolados que apresentam valores superiores a 70% de ligação DNA-DNA e valores menores que 5% de diferença em sua temperatura de fusão (ΔTm) são considerados pertencentes à mesma espécie (Gevers *et al*., 2005).

MLST (*Multilocus Sequence Typing*). Tipagem de sequências multilocus: Método para a caracterização genotípica de bactérias, archaeas e fungos ao nível intraespecífico, utilizando disparidades alélicas de um pequeno número (normalmente 7) de genes *housekeeping* (genes de manutenção). Método concebido como uma ferramenta de epidemiologia molecular e utilizado para o reconhecimento de estirpes distintas dentro de uma espécie (Gevers *et al*., 2005; Sullivan *et al*., 2005).

MLSA (*Multilocus Sequence Analysis*). Análise de sequências multilocus: Método para a caracterização genotípica de um grupo mais

diverso de procariotos (incluindo gênero), utilizando as sequências de vários genes codificadores de proteínas (Gevers *et al*., 2005).

Os fungos foram incluídos por Linnaeus, em 1973, no Reino Vegetal, já que sua classificação contava apenas com os reinos Mineral, Vegetal e Animal. Foi somente em 1968 quando Robert Whittaker sugeriu uma nova classificação dos seres que vivos, dividindo-os em 5 reinos distintos, que os fungos foram alocados em seu próprio grupo, o Reino Fungi. Após muito esforço e trabalho por parte dos taxonomistas e micologistas, os fungos foram colocados na Divisão Eumycota (Figura 1.6), que por sua vez está incluída no domínio Eukarya.

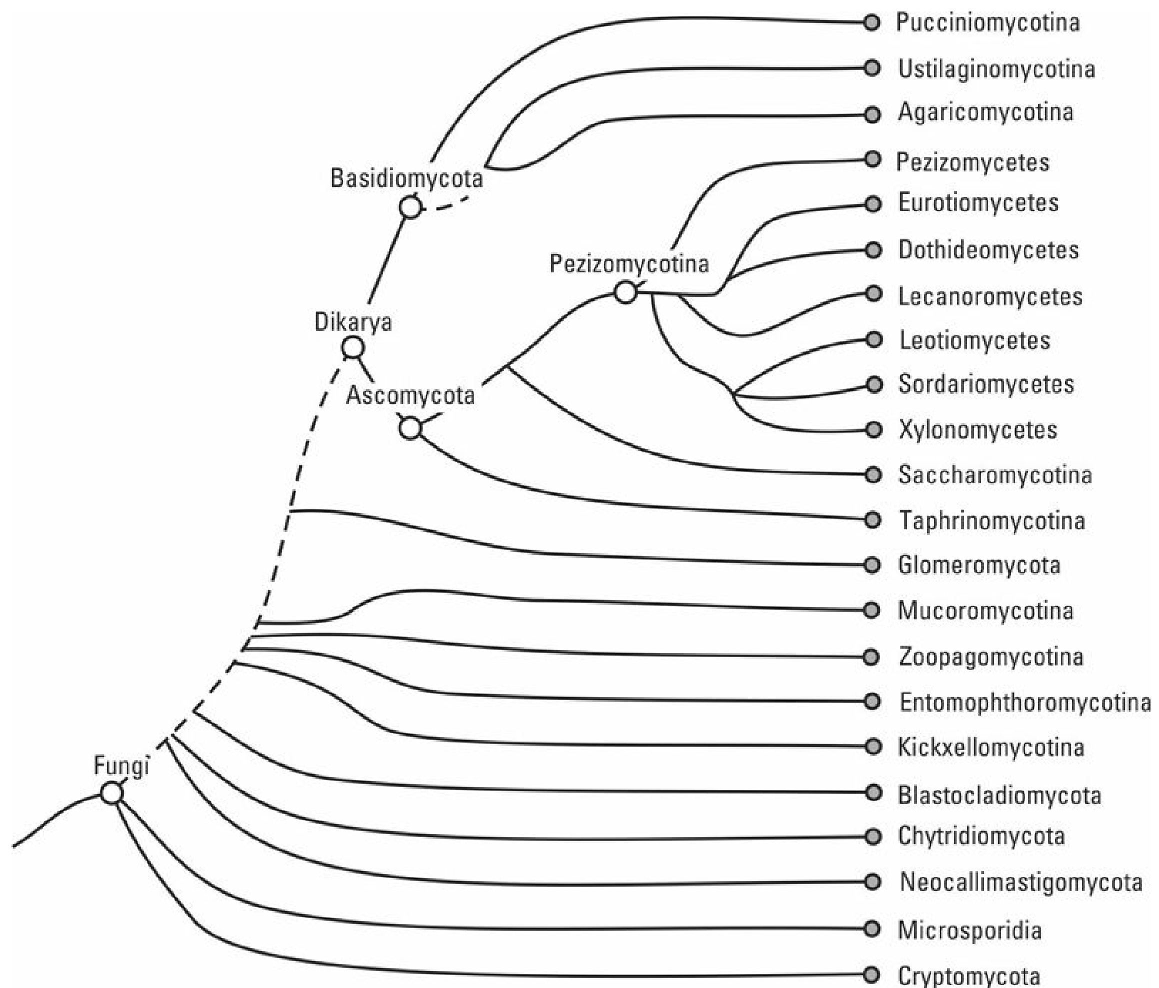


FIGURA 1.6 Árvore da vida dos fungos mostrando as relações filogenéticas entre os principais grupos de fungos. *Fonte:* Grigoriev *et al*. (2014).

Existem cerca de 100 mil espécies de fungos aceitas (Kirk *et al*., 2008) e mais de 400 mil nomes de espécies (Hibbett e Taylor, 2013), incluindo os milhares de sinônimos, que estão registrados na literatura. O número estimado de espécies existentes na Terra é de cerca de 1,5 milhão (Hawksworth, 1991) a 3 milhões (Hawksworth, 2012), ou seja, muitas novas espécies ainda estão para ser descritas. Isso mostra como a taxonomia é desafiadora para grupos como dos fungos, que possuem uma ampla variedade de estruturas morfológicas, sistemas genéticos, ciclos de vida e interações intraespecíficas que podem dar origem a novas variedades, mantendo ou não algumas adaptações. Alguns fungos são macroscópicos (como cogumelos, orelhas-de-pau, fungos em forma de taça, trufas), outros são fungos filamentosos microscópicos (como *Aspergillus* e *Penicillium*) e outros, ainda, são leveduras (como *Saccharomyces cerevisae* e *Candida*), dentro deste universo também estão presentes os líquens, uma associação simbiótica de fungos com algas. Em relação ao ciclo de vida, os fungos podem apresentar duas etapas distintas, uma fase assexuada (quando são chamados de anamorfos ou fungos mitospóricos) e uma fase sexuada (chamados de teleomorfos). Quando as duas etapas são conhecidas, o fungo é chamado de holomorfo, que representa a descrição completa do fungo. No entanto, muitos fungos somente apresentam uma fase conhecida, ou a anamórfica ou a teleomórfica. Devido a essa grande diversidade, muitas sobreposições e ambiguidades são observadas entre as espécies descritas, principalmente em relação ao duplo nome dado às formas assexuada e sexuada.

Essas ambiguidades e sobreposições aconteciam porque a classificação das espécies de fungos era baseada em caracteres morfológicos, especialmente em estruturas sexuadas e fisiológicas. O sequenciamento de genes e regiões do DNA, juntamente com estudos filogenéticos, revolucionou a taxonomia dos fungos, contribuindo ainda para solucionar a classificação de formas estéreis e apenas assexuadas.

Para normatizar e organizar a nomeação dos fungos, os micologistas aderiram ao Código Internacional de Nomenclatura Botânica, que foi rebatizado como Código Internacional de Nomenclatura para Algas, Fungos e Plantas (ICN). O ICN aboliu recentemente (2011) o sistema de nomes duplos para os fungos (anamorfo/teleomorfo) e as descrições em latim (em inglês é suficiente), permitiu a publicação de novos nomes em periódicos online, sem necessidade de estarem em versões impressas, e exigiu o registro desses novos nomes de fungos em um banco de dados público, como o *Index Fungorum* ou o Mycobank (Hibbett e Taylor, 2013).

Ainda hoje, o estudo de caracteres morfológicos é de extrema importância na identificação e caracterização de espécies. As diversas

técnicas de microscopia óptica (de contraste de fase e de contraste de interferência diferencial, por exemplo), coloração diferencial, microscopia eletrônica de varredura e de transmissão, entre outras, têm contribuído sensivelmente para o detalhamento e especialização dos critérios utilizados na identificação de espécies (Sharma *et al.*, 2015). A caracterização fisiológica também permanece sendo um fator importante na delimitação de espécies. Os caracteres fisiológicos como temperatura de crescimento, pH, salinidade, etc. descrevem muito sobre a adaptação da espécie a determinado nicho ecológico e, portanto, são muito importantes no que diz respeito à especiação. Associada a esses fatores, a quimiotaxonomia, relacionada principalmente com a utilização de proteínas, carboidratos e proteínas pelos fungos, é também um critério de identificação de espécies, principalmente no caso de leveduras.

Estudos fundamentados em marcadores moleculares revolucionaram a taxonomia dos fungos. Hibbett *et al*. (2007) propuseram uma nova classificação filogenética dos fungos baseada em dados de sequências de DNA e análises filogenéticas, que é amplamente aceita pelos micologistas e que até o momento está em construção (Figura 1.6), já que muitos grupos ainda não tiveram sua filogenia resolvida e atualizada.

Diversas regiões e genes do RNA ribossômico e mitocondrial têm sido utilizados para fins de identificação dos fungos, como, por exemplo: 18S rRNA (SSU rRNA), 28S rRNA (LSU rRNA), a região do espaçador interno transcrito (ITS) e do espaçador da região intergênica (IGS1), as subunidades do RNA ribossômico mitocondrial (mtSSU e mtLSU). Genes codificadores de proteínas também têm sido utilizados para a identificação, como RNA polimerase II (rpb1 e rpb2), β-tubulina (β-Tub), calmodulina (cal), γ- actina (act), ATP-sintase (atp6) e o fator de alongamento 1α (EF-1α).

Estudos sobre diversidade, identificação, taxonomia e filogenia de muitos organismos eucariotos baseados em sequências de DNA utilizam-se da região ITS do rDNA, uma importante ferramenta na separação de grupos de fungos, diferenciando tanto gêneros quanto espécies (White *et al*., 1990), por isso, essa região tem sido reconhecida como um marcador de código de barras dos fungos após uma fina seleção (Schoch *et al*., 2012). A região ITS é uma unidade de repetição nuclear ribossomal que está localizada entre os genes 18S e 28S do rDNA e que é composta por três partes: a região ITS1 (rápida evolução), o gene 5.8S (muito conservado) e a região ITS2 (de evolução moderadamente rápida) (White *et al*., 1990; Hillis e Dixon, 1991; Horton e Bruns, 2001). As regiões dos ITS1 e ITS2 são frequentemente utilizadas em estudos taxonômicos por evoluírem mais rapidamente e, portanto, serem altamente variáveis (Nilsson *et al*., 2010), elas também mostram diferentes porcentagens de variação entre as espécies. A região

ITS, apesar de oferecer outras vantagens, como apresentar cópias muito semelhantes e ser amplificada com muita facilidade até mesmo em amostras de baixa qualidade (Nilsson *et al*., 2010), também possui algumas limitações. Uma das limitações é que em alguns gêneros essa região não apresenta alto grau de resolução entre as espécies, sendo necessário o sequenciamento de genes adicionais, como, por exemplo, EF-1α em *Fusarium* e β-tubulina em *Cylindrocladium* (Shenoy *et al*., 2007), para as leveduras, verificou-se que LSU rRNA pode gerar uma melhor resolução do que a região ITS na identificação de espécies e, portanto, o sequenciamento de ambas as regiões é necessário. Outra limitação é a grande variação intraespecífica da região ITS, o que dificulta a determinação mais adequada quanto ao limite de corte de similaridade na comparação entre sequências (O'Brien *et al*., 2005). O grau de variação de sequências entre espécies de fungos é uma questão que merece maior atenção, porém o agrupamento de sequências com similaridade igual ou superior a 98% da região ITS, por exemplo, é, provavelmente, uma medida conservadora, segura e mais atual da riqueza de espécies (Singh *et al*., 2012).

Para a resolução desses problemas, tipagens de sequências multilocus (MLST) podem ser adotadas. Geralmente, o sequenciamento MLST envolve de 7 a 8 genes e, tem um grande potencial na separação das espécies de micro-organismos (Taylor e Fish, 2003) e tem ajudado a separar alguns complexos de espécies crípticas, como *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride, Fusarium oxysporum, Histoplasma capsulatum* e *Candida albicans*. O sequenciamento MLST vem de encontro com o reconhecimento de espécie filogenética por concordância genealógica (GCPSR – *Genealogical Concordance Phylogenetic Species Recognition*), ou seja, para separar uma espécie é necessária a concordância de mais de um gene na genealogia e que é amplamente difundido em taxonomia fúngica (Taylor *et al*., 2000).

A Bioinformática é uma ferramenta fundamental na utilização de dados estruturais e moleculares na reconstrução filogenética para o reconhecimento de espécies. O grande número de genes agora disponíveis para estudos filogenéticos de fungos trouxe novos desafios para a bioinformática, como a melhoria das ferramentas para visualização e montagem de árvores filogenéticas em grande escala e de métodos de pesquisa filogenética que possam ser implementados em supermatrizes contendo milhares de *taxa*, assim como, a necessidade da ampliação de bancos de dados que contam com a participação da comunidade científica, como o AFTOL, por exemplo (McLaughlin *et al*., 2009).

Os desafios que se impõem atualmente em taxonomia fúngica estão relacionados, principalmente, com as estratégias que serão desenvolvidas para classificar sequências ambientais, já que existe um número crescente

de sequências não identificadas depositadas nos bancos de dados, especialmente oriundas de estudos metagenômicos. Um bom exemplo disso é o filo Rozellomycota, cuja maior parte de sua diversidade é conhecida apenas por sequências ambientais. Semelhante ao que ocorre com os procariotos, tem-se sugerido o status *Candidatus* para espécies não cultivadas. Também foram sugeridas as denominações ENAS (sequência de ácido nucleico ambiental) ou eMOTU (unidade taxonômica operacional molecular ambiental), mas será necessário um esforço significativo da comunidade científica para desenvolver os protocolos necessários que permitam o desenvolvimento e a implementação massiva da taxonomia baseada em dados de sequências (Hibbett e Taylor, 2013).

De maneira geral, a taxonomia dos procariotos parece estar mais bem sistematizada (até o presente momento) do que a taxonomia dos fungos, já que apenas nomes validados de novas espécies de procariotos são publicados no International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology (IJSEM). O International Code of Nomenclature of Bacteria também especifica os meios técnicos para reconhecer novas espécies de procariotos. Essas centralizações não ocorrem em relação aos fungos, permitindo que existam critérios de reconhecimento de espécies não uniformes. Por exemplo, muitas descrições de espécies novas não apresentam dados moleculares, além de um grande número de sinonímias e muitas mudanças na classificação de espécies. Por outro lado, essa descentralização na taxonomia dos fungos, favorece atualizações que taxonômicas sejam mais rápidas (Hibbett e Taylor, 2013). No entanto, em médio prazo, espera-se que haja uma maior sistematização na taxonomia dos fungos, principalmente no que tange à resolução do sistema de nomenclatura unitária para os fungos pleomórficos (fungos que apresentam mais de uma forma reprodutiva), de modo a facilitar a identificação, classificação e descrição de espécies, especialmente para os futuros microbiologistas.

1.4. Bioprospecção no solo

O solo pode ser reconhecido como um conjunto de aglomerações heterogêneas que se apresenta em constantes condições de variabilidade. Essa interface de natureza volúvel está sujeita a flutuações do estado de redox, constituições de matéria orgânica, condições de lixiviação e erosão (Hedges e Oades, 1997). O ambiente de sedimento, que engloba o solo em contato com água de ambiente marinho ou lacustre pode ser igualmente volúvel em suas interfaces. Sedimentos em águas rasas de baixo fluxo, por vezes, recebem altas quantidades de matéria orgânica, se tornando o berço de ecossistemas microbianos altamente diversos (Yazdani e Fotoshomi *et al*., 2015). Fatores bióticos e abióticos constantemente influenciam os solos da superfície terrestre (Smykla *et al*., 2015). Esses fatores incluem desde toda biota presente até incidência de UV, temperatura, umidade e muitos outros.

O solo é uma vasta fonte microbiana, que por sua condição heterogênea e altamente variável, abriga centenas dos mais diversos micro-habitats. A variabilidade do solo gerou, por milhares de anos, a adaptação de comunidades microbianas para colonizar os substratos ali presentes. A diversidade microbiana é constantemente medida em ecologia pela quantidade de diferentes espécies (riqueza), e por sua abundância relativa (equabilidade) (Nannipieri *et al*., 2003). A biomassa microbiana é também muito ampla em números absolutos. Em pradarias, bactérias e fungos foram estimados em 1–2 e 2–5 $t.ha^{-1}$, respectivamente (Killham, 1994). Consequentemente, o solo é alvo de grande parte dos estudos em bioprospecção na procura por micro-organismos competentes no cenário industrial.

A indústria biotecnológica realiza constantemente bioprospecção de células microbianas no solo para a produção de substâncias biológicas, incluindo combustíveis, alimentos, medicamentos, hormônios, enzimas, proteínas e ácidos nucleicos. As possibilidades da bioprospecção são virtualmente infinitas considerando os reservatórios de genes e recursos genéticos dentro dos micro-organismos presentes nos solos.

Fungos e bactérias evoluíram por milhões de anos para se tornarem saprofíticos no solo e, por isso, a biodegradação é amplamente difundida nas comunidades do solo (Prenafeta-Boldú *et al*., 2006). Por isso, frequentemente encontramos esses micro-organismos degradando compostos e, consequentemente, biorremediando o ambiente, ou utilizando seu metabolismo ou parte dele (uma enzima) em algum processo de degradação interessante para a indústria.

Na verdade, micro-organismos em todos os 3 Domínios são alvo de bioprospecção no solo, porém a variabilidade inerente ao ambiente do solo exige uma busca precisa e focada. O primeiro passo na procura dessas estirpes é a escolha do local bioprospectado. O ambiente ao redor do solo e suas características têm enorme influência nas comunidades microbianas presentes. Os pesquisadores experientes irão sempre utilizar esse conhecimento em seu favor, ou seja, a pressão seletiva do ambiente para isolar micro-organismos alvo. Por exemplo, ambientes extremos podem ser alvo de enzimas termo e/ou ácido-resistentes; ambientes contaminados são constantemente alvo de bioprospecção por degradadores desses mesmos contaminantes; ambientes com escassez de matéria orgânica e com muita competição por substratos podem ser alvo de produtores de antibióticos. Entretanto, os micro-organismos não são apenas um subproduto do meio, algumas comunidades podem ser consideradas o próprio ambiente. Isso porque as diversas atividades microbianas constantemente modificam os solos, um exemplo notável é a atividade fúngica que influencia o solo através de mecanismos eletrostáticos, adesivos e sequestradores (Rillig e Mummey, 2006). Fungos também afetam as propriedades de infiltração da água nos solos através da produção de grandes quantidades de compostos hidrofóbicos (Wösten *et al*., 1999). E esses são apenas alguns exemplos de reações globais modificando o ambiente ao redor das comunidades microbianas. Todavia, mudanças ambientais têm o potencial para alterar a comunidade vigente, alterando assim o próprio solo. As atividades antropogênicas frequentemente o fazem, e por isso elegem por pressão seletiva comunidades microbianas divergentes, que são também, em diversas ocasiões alvos para bioprospecção (Brito *et al*., 2013). As regiões mais extremas e inexploradas também podem ser alvo de bioprospecção, a Antártica, por exemplo, abriga diferentes comunidades e tem sido estudada devido à sua diversidade de metabolismos, genes e diferentes subprodutos (Godinho *et al*., 2015).

1.5. Bioprospecção na água

A água tem papel importante na composição de todos os organismos vivos. Ao mesmo tempo, representa o solvente e o carreador de compostos nos diversos ambientes. Quando falamos de ambiente aquático, temos que fazer logo a distinção de águas doces e salgadas. Outro aspecto importante é a dinâmica destas águas, que poderão favorecer o desenvolvimento de diferentes nichos e, consequentemente, o estabelecimento de comunidades com maior ou menor diversidade (Paulse *et al*., 2014; Drummond *et al*., 2015). Rios e riachos desempenham um papel importante na integração dos ecossistemas, percorrendo distâncias e carreando micro-organismos e nutrientes. Ao longo dos rios e riachos, de montante a jusante, temos uma grande variação da biodiversidade e dos biofilmes formados (Besemer *et al*., 2013).

Os rios e lagos estão frequentemente vinculados a atividades de lazer e de transporte das populações circunvizinhas. Podem também ser usados como fonte de água para abastecimento das cidades. Nas áreas urbanas eles podem ser fonte de preocupações no que tange à possibilidade de contaminação por micro-organismos patogênicos (Castillo *et al*., 2013; Alam, 2013).

O oceano foi o berço da vida em nosso planeta. A partir dos primeiros micro-organismos, a evolução se encarregou de gerar toda a diversidade que podemos vislumbrar atualmente através das diferentes tecnologias de análise. O ambiente marinho é considerado o maior e mais dinâmico habitat do planeta, onde se observam variações de pressão hidrostática e de temperatura, de disponibilidade de matéria orgânica, de fito-detritos, ativando a produção de várias enzimas microbianas e compostos importantes para a medicina e para a indústria (Bibiana e Nithyanand, 2014). Micro-organismos aquáticos também estão associados à produção de biofilmes, por isto, pedaços de rochas do fundo de rios e lagos podem ser utilizados como amostragem para isolamento das espécies ali aderidas (Vester *et al*., 2014).

Atualmente, há grande interesse da comunidade científica em micro-organismos marinhos que ofereçam moléculas bioativas com potencial biotecnológico. Micro-organismos tolerantes ao sal, por exemplo, podem ser aplicados em terapêutica humana (Leary, 2008). Muitas espécies ainda não são conhecidas, porém os estudos já realizados mostram a presença de um conjunto de adaptações morfológicas, fisiológicas e enzimáticas. O ambiente marinho ainda é pouco explorado frente ao seu grande potencial

de isolamento de novos micro-organismos e de componentes bioativos com aplicação biotecnológica. Encontramos na literatura vários exemplos de compostos bioativos com ação antitumor, anticâncer, antiproliferação, citotóxicos, antibióticos, foto-protetores e inibidores de formação de biofilmes. Entre os micro-organismos que representam fontes de produtos biomédicos estão bactérias, actinomicetes, fungos e vírus. Os três domínios da vida na Terra, Archaea, Bactéria e Eukarya, identificados por meio de sequenciamento de RNA ribossomal, estão presentes no ambiente marinho (Yu *et al*., 2011).

O isolamento de bactérias marinhas requer meios com menor concentração de nutrientes. Geralmente suas células têm um tamanho menor, parecem ter um menor conteúdo de DNA, e suas enzimas apresentam maior afinidade pelos substratos. Grande percentual das regiões oceânicas encontra-se em baixas temperaturas, proporcionando uma biodiversidade adaptada de alguma forma a temperaturas mais baixas (Leary, 2008).

Os ecossistemas marinhos de baixas temperaturas, representados pelas regiões dos oceanos Ártico e Antártico, têm sido investigados quanto à produção de enzimas hidrolíticas ativas a baixas temperaturas. O primeiro passo é analisar a diversidade microbiana presente. Os principais habitats pesquisados na região do oceano Ártico são fiordes glaciais (vales estreitos cercados por paredões rochosos), escoamento glacial, neve compacta, habitats subglaciais e periglaciais, sedimento e áreas permanentemente congeladas (*permafrost*) (Reddy *et al*., 2009).

O isolamento de micro-organismos presentes na água envolve, geralmente, o uso de garrafões esterilizados que permitam a coleta de grandes volumes de água. O material deve ser mantido refrigerado até o processamento. No laboratório, a água é filtrada, sendo os filtros colocados sobre os meios seletivos adequados. Alternativamente, pode ser realizada a centrifugação, seguida de ressuspensão em pequenos volumes de meio de enriquecimento, para depois então semear nos meios seletivos de escolha, conforme o grupo de micro-organismos que se deseja isolar (APHA, 2005). Nos ambientes marinhos, por exemplo, os micro-organismos estão frequentemente associados a partículas. Neste caso, a técnica de microencapsulação pode ser útil no isolamento por favorecer a preservação do micro-organismo (Rathore *et al*., 2013). A microencapsulação utiliza uma matriz como base para uma barreira envoltória (geralmente feita de alginato, xantana, goma de gelano ou quitosana) que protege células biológicas contra o meio ambiente (Solanki *et al*., 2013). Um esquema de análises de micro-organismos a partir de água está representado na Figura 1.7.

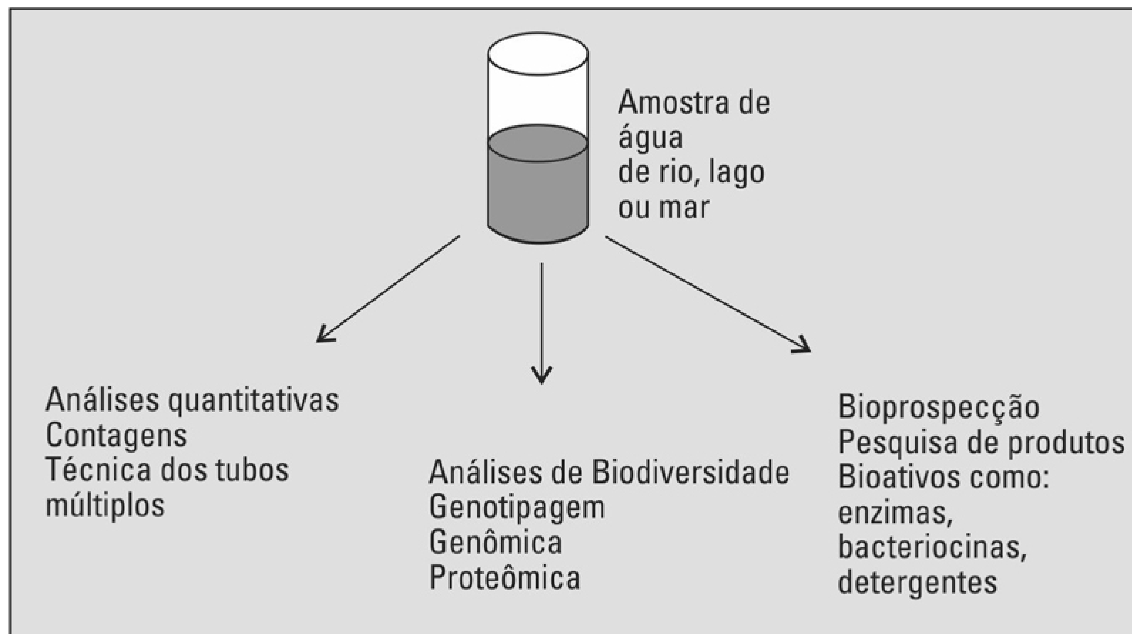


FIGURA 1.7 Possíveis abordagens para análise de micro-organismos aquáticos.

Existem várias enzimas ativas em baixas temperaturas que têm alto potencial biotecnológico, tais como proteases, lipases, celulases e amilases (Leary, 2008). As moléculas produzidas por micro-organismos psicrofílicos ou psicotolerantes podem ser aplicadas em diferentes áreas, a saber: enzimas utilizadas em processos industriais, biorremediação e controle de poluição; proteínas anticongelamento e suplementos alimentares, como ácidos graxos poli-insaturados; substâncias de uso médico/farmacêutico (Leary, 2008). A atividade enzimática destes micro-organismos pode se revelar mais eficiente do que a apresentada por micro-organismos mesofílicos. É o que se observa, por exemplo, nos experimentos de biorremediação (Leary, 2008).

Entre as substâncias que têm sido bioprospectadas em micro-organismos marinhos estão as bacteriocinas, que são peptídeos produzidos ribossomicamente por bactérias e com atividade antimicrobiana em nanoconcentrações (Nes, 2011). Elas são capazes de inibir ou matar outras bactérias e podem ser utilizadas na indústria de alimentos, ou de cosméticos, como conservantes ou na indústria farmacêutica (Desriac *et al.*, 2010; Bibiana e Nithyanand, 2014). As bacteriocinas inicialmente descritas em *Escherichia coli* foram classificadas em 1957 por Fredericq em 17 grupos: A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, V, S1, S2, S3, S4 e S5 baseado na especificidade do receptor. Posteriormente, foram propostos subgrupos (Colicinas E1, E2, E3) baseado nos fenótipos de imunidade. Em seguida, foi realizada uma classificação considerando estirpes produtoras de mesma espécie, mas de

cepas diferentes (Daw e Falkiner, 1996). Algumas bactérias utilizadas em alimentos (bactérias ácido-láticas) como probióticos são produtoras de bacteriocinas, isto favoreceu o reconhecimento de algumas substâncias, como a nisina, como seguras (GRAS – *Generaly Reconized As Safe*) no FDA (Food and Drug Agency) (Nes, 2011). Como as bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas mostravam, em geral, um espectro de ação mais ampla, várias bacteriocinas produzidas por bactérias Gram-positivas foram descritas e receberam uma classificação conforme sua estrutura, espectro e mecanismos de ação (Nes, 2011). Atualmente, existem relatos de bacteriocinas produzidas por Bactérias (Gram-positivas e Gram-negativas) e Archaeas (O'Connor *et al*., 2002).

1.6. Bioprospecção – coleta, isolamento e cultivo

A coleta de amostras para bioprospecção pode ocorrer em ambientes naturais não modificados como solo, água ou sedimentos, mas também pode ocorrer em ambientes modificados pelo homem como o solo agrícola, resíduos industriais e ambientes poluídos. Todo protocolo de coleta deve descrever os procedimentos, os equipamentos e outras considerações específicas para a coleta de amostras representativas. Quando seguidas, estas orientações protocoladas servem para manter a integridade da amostra, preservando a forma física e composição química da melhor forma possível (NJDEP, 2005). Em seguida, a prioridade é a preservação da amostra coletada, que tem como principal objetivo manter os micro-organismos viáveis para o isolamento. Por isso, manter as características determinantes, tais como pH e temperatura, dentro do espectro de condição viável dos micro-organismos alvo é essencial. Geralmente o resfriamento da amostra ajuda a reduzir o metabolismo preservando a viabilidade, e diminuindo atividades oxirredutoras que modificariam as comunidades vigentes ao longo do tempo.

O próximo passo da bioprospecção é o isolamento de micro-organismos alvo, esse por sua vez é inteiramente dependente de nossa capacidade em cultivá-los. Se um micro-organismo não é capaz de crescer e se multiplicar em meios de cultura artificiais não seremos capazes de utilizar seu metabolismo em escala industrial. Por essa razão, técnicas tradicionais de isolamento são baseadas nos micro-organismos cultiváveis. Os meios de cultivo tentam mimetizar o ambiente natural microbiano e podem ser, por composição, divididos em meios quimicamente definidos e meios complexos. Os meios quimicamente definidos possuem em sua composição quantidades específicas de cada composto orgânico simples e/ou inorgânico. Em contrapartida os meios complexos possuem em sua composição compostos como carne, soja ou extrato de levedura, que apesar de nutritivos, não estão previamente definidos em composição (Madigan *et al.*, 2004).

Independente da composição, os meios de cultura são comumente utilizados tanto para bioprospectar por isolamento seletivo, quanto para transportar, estocar e fermentar produtos em bioprocessos industriais. Na Tabela 1.1 é possível observar sumarizado alguns dos tipos de meios de cultura mais comumente utilizados.

Tabela 1.1

Principais tipos de meios de cultura para isolamento de micro-organismos utilizados em bioprospecção

Meio de cultivo	Conceito	Objetivos	Exemplos
Enriquecimento	Rico em nutrientes com condições ideais de pH e temperatura para o tipo de estirpe escolhida	Ativação de micro-organismos latentes, crescimento de heterotróficos exigentes (fastidiosos) e geração e/ou aumento de massa celular vegetativa	Caldo Tetrationato, Selenito-Cistina, Caldo Brain Heart Infusion (BHI)
Transporte	Pobre ou livre de nutrientes, atenua ou impede todo tipo de reação com tampões de pH e agentes redutores. Geralmente usado em baixas temperaturas em relação ao ótimo da estirpe alvo	Impedir a morte precoce de micro--organismos. Reduzir o metabolismo e prevenir ao máximo mudanças no comportamento microbiano que ocorreriam no micro-habitat natural	Meio de Stuart, Meio de Cary--Blair e Caldo Tioglicolato
Redutor	Meio que emprega substâncias oxirredutoras que capturam substâncias tóxicas para determinados micro-organismos	Isolar ou crescer micro-organismos anaeróbicos estritos ou anaeróbicos facultativos em ambiente sem oxigênio	Caldo tioglicolato de sódio
Seletivo	Utiliza pH, temperatura, pressão osmótica, substâncias tóxicas, antibióticos para inibir micro-organismos indesejados	Elege micro-organismos alvo inibindo o crescimento dos demais	Ágar Manitol Salgado, Ágar MacConkey e Caldo Verde Brilhante
Diferencial	Utiliza fermentações específicas e substâncias reveladoras para obter informações de características fisiológicas	Discernir um tipo de micro-organismo alvo dos demais, geralmente através de corantes, e/ou detectar características fisiológicas de uma única estirpe ou de um grupo de micro-organismos	Ágar Eosina Azul de Metileno, Ágar Salmonella-Shigella e Baird-Parker

Na literatura é possível encontrar diversos estudos utilizando as técnicas tradicionais de cultivo para isolar e selecionar micro-organismos de interesse no solo (Siddique *et al.*, 2014; Kang *et al.*, 2014), assim como podemos encontrar as técnicas adequadas de práticas e manuseio para o isolamento eficiente e adequado de micro-organismos (Vermelho *et al.*, 2006). Porém, é importante lembrar que não existe conceito definitivo sobre a prática mais adequada de isolamento. Devemos sempre ter em mente que o tipo de comunidade microbiana estudada direciona para as técnicas utilizadas, lembrando, assim, que os meios de cultura e seus

objetivos (Tabela 1.1) são dispostos conforme a necessidade. Entretanto, devemos sempre admitir as capacidades e limitações dessa técnica. Isso porque, como citado anteriormente, apenas micro-organismos cultiváveis são possíveis de ser estudados dessa maneira. Diversos autores especulam as capacidades do isolamento através do plaqueamento tradicional, Nikolaki e Tsiamis (2013), por exemplo, estimam que a fração dos não-cultiváveis seja quase a totalidade, e que estes micro-organismos são na verdade 99% de toda massa microbiana existente. Sendo assim, quando utilizarmos contagens e plaqueamento tradicionais, é importante lembrar que essas amostras são representativas apenas dessa fração cultivável.

1.7. Bioprospecção genética

A grande variabilidade inerente ao ambiente do solo faz com que muitos autores conceituem esse ambiente como uma grande “caixa preta” (Tiedje *et al*., 1999). Caixa preta é uma metáfora para um ambiente com tantos fatores, e tão variavelmente entrelaçados, que nada se pode afirmar sobre eles.

No solo os micro-organismos abrangem uma enorme parte da biodiversidade terrestre e realizam um papel vital nos ciclos biogeoquímicos, e consequentemente no funcionamento de todos os ecossistemas terrestres (Green *et al*., 2004). Porém, a “caixa preta” nos permitiu, até o momento, obter pouquíssima informação sobre os micro-habitats do solo. Apesar de reconhecermos a presença microbiana, sabemos muito pouco sobre sua fisiologia no solo. Alguns autores estimam que, dependendo do ambiente, somente 1-10% da vida microbiana no solo pode ser cultivada sob condições de laboratório (Nannipieri *et al*., 2003). Isto é ainda mais evidente quando se considera que mais de 88% de todos os isolados bacterianos pertencem a apenas quatro filos de bactérias: o Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria e Bacteroidetes. (Nikolaki e Tsiamis, 2013). Autores como Torsvik *et al*. (1996), por exemplo, já calcularam a presença de cerca de 6.000 diferentes genomas bacterianos por grama de solo, tendo o tamanho do genoma de *Escherichia coli* como uma unidade.

A fim de superar essa barreira tecnológica que não só impede estudos ecológicos dessa enorme fração microbiana, mas também dificulta o isolamento e cultivo para bioprospecção, são utilizadas técnicas de biologia molecular. As técnicas moleculares para bioprospecção são, em suma, formas de “capturar” genes de interesse, que são posteriormente utilizados em outros micro-organismos viáveis industrialmente. Essa tecnologia realiza a chamada “expressão heteróloga”, que será melhor elucidada no Capítulo 5. Técnicas de microarranjo e de PCR em tempo real (RT-PCR) são alguns exemplos dessas técnicas que, utilizadas em ecologia, também contribuem para bioprospectar genes de interesse. O princípio básico dos microarranjos se baseia na propriedade de uma molécula de DNA de cadeia simples para hibridar com moléculas complementares, um suporte sólido ligado a sondas complementares é o que “captura” os genes alvo. As leituras são detectadas como sinais fluorescentes emitidos por corantes incorporados na amostra (Zhou, 2003). PCR em tempo real utiliza a fluorescência para uma quantificação em tempo real dos produtos de

amplificação (amplicons) durante ou no final de cada ciclo utilizando marcadores fluorescentes.

Um importante conceito é que técnicas moleculares não só compreendem diversas ferramentas de bioprospecção genética no ambiente, como também geram ao longo dos anos bibliotecas metagenômicas. As bibliotecas geradas são resultados de compêndios genéticos do estudo de um determinado gene em uma comunidade, e também são fontes de bioprospecção para novas enzimas e biomoléculas, apesar de conterem em sua maioria micro-organismos não cultiváveis. As bibliotecas metagenômicas, combinadas às tecnologias de expressão heteróloga, são ferramentas relevantes no estudo da biodiversidade microbiana para desvendar a "caixa preta" e no desenvolvimento de biotecnologias em favor da humanidade.

1.8. Características microbianas para uso industrial

Antes de entrarmos nas características que os micróbios devem apresentar para a sua utilização na indústria é necessário destacar que os bioprocessos são bastante variados e podem ser separados em relação ao tipo de produto gerado:

1) Quando a utilização do micróbio é para a produção de moléculas específicas, tais como enzimas, proteínas que não enzimas, vitaminas, lipídeos, carboidratos, antibióticos, anticorpos, etc. (exemplos nos Capítulos 9, 11, 12, 13, 14 e 15);
2) Quando o bioprocesso é para produção de um inoculante (agrícola ou para utilização em biorremediação) ou de inóculos (fermentos) como os produzidos para a indústria de alimentos, neste caso o produto é o próprio organismo entregue como massa celular concentrada (exemplos descritos no Volume 2 deste livro);
3) Transformação do meio ou substrato em um produto simples (modificação de hormônios) ou complexo (por exemplo, leite em queijo, iogurte, etc.; mosto em bebida fermentada) (exemplos descritos no Volume 2 deste livro.

Em termos gerais, as duas características iniciais que um micróbio deve apresentar para ser utilizado em aplicações industriais são referentes à não patogenicidade e à sua estabilidade. Os organismos empregados devem ser não patogênicos ou, ao menos, que não se tenha conhecimento de alguma relação com doença ou intoxicação. Isto é o que se conhece por *Generally Recognized as Safe* – GRAS ou em tradução literal: Geralmente Reconhecido como Seguro. GRAS é uma designação da FDA (Food and Drug Agency dos EUA) para substâncias seguras que posteriormente por extensão passou também a ser aplicada a micróbios. Pequenas variações na produção ou crescimento são comuns em processos biológicos, porém essas devem ter um nível mínimo e até certo ponto previsível, dentro de uma margem previamente estabelecida. Variações acima do limite ou imprevisíveis podem inviabilizar a utilização ou até o desenvolvimento de um processo. Outra característica importante que tenha sua manipulação genética relativamente fácil: incrementos da eficiência de produção podem ser obtidos por mutação e seleção e, logicamente, formar um bioprocesso que seja lucrativo. Os bioprocessos na indústria estão inseridos em cadeias econômicas e, portanto, têm que apresentar relações de custo/retorno

viáveis e também competitivas em relação ao que já existe no mercado. Essa concorrência não se restringe a outros bioprocessos, ela se expande para processos químicos e para a agroindústria. Então, para garantir a viabilidade das aplicações, algumas características devem ser observadas, como as citadas na Tabela 1.2.

Tabela 1.2

Características gerais que os organismos devem apresentar para aplicações industriais

Característica	Apresenta	Não apresenta	Observação
Alta eficiência na conversão de substrato em produto	Quanto mais eficiente melhor será o retorno do bioprocesso	Aceitável apenas para produtos de alto valor	-
Grande acúmulo do produto no meio	Maior facilidade na purificação ou obtenção do produto	-	-
Não necessita de processo complexo	Maior maleabilidade do organismo permite considerável diminuição nos custos de produção	Aceitável apenas para produtos de alto valor	Crescimento ou produção em faixas de valores de pH ou temperatura
Não necessita de meio de cultivo de custo elevado	-	Aceitável apenas para produtos de alto valor	Os substratos comuns já representam um custo elevado em relação ao processo
Não produz substâncias incompatíveis	Aumento do rendimento	Maior gasto com purificação	-
Não patogênico (GRAS)	Operação do processo é mais simples	Elevado nível de segurança no processo e no descarte de resíduo, aumento considerável dos custos	Utilizado apenas quando não se tem ou não existe alternativa, como no caso da produção de vacinas
Estável	Viável	Inviável	-
Facilidade de manipulação genética	Possibilita incrementos de produtividade	-	Característica pode ser transferida para sistema de expressão heteróloga

Atualmente a maior parte dos bioprocessos, em termos de variedade de tipos de processo, mas não em quantidade de produto produzido, emprega a utilização de sistemas de expressão heteróloga em células hospedeiras (Tabela 1.3). Nestes sistemas, a célula hospedeira, também chamada de sistema de expressão, é modificada pela inserção de genes de interesse encontrados em outro organismo (doador). Geralmente, os genes são montados em vetores de expressão de plasmídeos, bacteriófagos ou cosmídeos (ver o Capítulo 6). Esta utilização é muito frequente nos bioprocessos das indústrias farmacêuticas e de enzimas. A escolha deste

tipo de sistema é feita pelo conhecimento que se tem das linhagens empregadas. Principalmente sobre as condições ótimas de cultivo, da confiança na estabilidade e na não patogenicidade. Os bioprocessos nestes sistemas são mais fáceis de se desenvolver e escalonar, economizando tempo e recursos. Porém, existem limitações e há uma constante busca de novos sistemas de expressão.

Tabela 1.3

Sistemas de expressão heteróloga mais utilizados e suas características gerais

Sistema de expressão	Vantagens	Desvantagens
Procariótico	Multiplicação celular rápida, baixo custo	Modificações pós-traducionais limitadas
Escherichia coli	Amplo conhecimento do organismo (genoma, fisiologia, transcriptoma, etc.)	Proteases
Bacillus megaterium	Menor degradação do produto por proteases	-
Bacillus subtilis	-	-
Eucariótico	Modificações pós-traducionais	-
Levedura	Baixo custo de produção, liberação extracelular do produto, fácil separação célula-meio de cultivo	Glicosilação excessiva
Saccharomyces cerevisiae	Amplo conhecimento do organismo (genoma, fisiologia, transcriptoma, etc.)	-
Komagataella (Pichia) pastoris	Fácil manipulação	Conhecimento sobre o organismo é limitado (porém em rápida expansão)
Fungo filamentoso	Modificações pós-traducionais mais refinadas que nas leveduras	Baixo rendimento, relativo desconhecimento sobre os organismos
Aspergillus nidulans	-	-
Aspergillus niger	-	-
Linhagens celulares de animais (insetos, mamíferos)	Modificações pós-traducionais refinadas	Alto custo de produção, manipulação das linhagens é laboriosa e requer mão de obra treinada

A utilização de organismos retirados da natureza para emprego em bioprocessos deve ser realizada com cautela. Pelo menos um mínimo de domesticação, no sentido de atender ao discutido nesta parte do capítulo, pode e deve ser praticado com o isolado de interesse. Uma característica a ser buscada é a estabilidade: um organismo que apresenta valores produtivos constantes permite que o desenvolvimento do processo caminhe com mais segurança e rapidez.

Neste caso é importante considerar que um micróbio que não apresente uma taxa de produção tão elevada ou que necessite de meios industriais de maior custo, mas por outro lado produza uma molécula de alto valor e sem

concorrência, pode ser economicamente viável. Por outro lado, um que tenha alta taxa de conversão de um meio de baixo custo, mas que ainda assim não seja competitivo, não dará retorno que justifique a sua continuidade. Portanto, a característica do micróbio para uso industrial deve também estar sempre pautada nesta relação de custo x retorno do bioprocesso em que está inserido.

1.9. Conservação de células microbianas

A abordagem clássica da biotecnologia consiste, basicamente, na busca de insumos biológicos a partir da coleta de amostras, isolamento, seleção e triagem de estirpes com características desejadas (Canhos *et al*., 2004), Desse modo, à manutenção e preservação de micro-organismos possui grande importância, devido à necessidade de utilização futura do espécime como fonte de recurso genético com as mesmas características identificadas quando isolado. Os métodos de conservação de células microbianas permitem a manutenção de características interessantes em estirpes com potencial biotecnológico. Os principais objetivos dos métodos existentes para preservação de micro-organismos são: proporcionar a manutenção da viabilidade durante o período de armazenamento; evitar ou minimizar a ocorrência de mutações que provoquem alterações no metabolismo da estirpe; e preservar a capacidade de armazenamento sem afetar as características genotípicas e/ou fenotípicas pelo maior tempo possível (OECD, 2007). A escolha do método a ser utilizado vai depender das exigências intrínsecas de cada micro-organismo em estudo, assim como das vantagens e desvantagens de cada técnica disponível. Cada grupo de micro-organismos possui peculiaridades que vão direcionar a seleção do método adequado, não havendo uma metodologia padronizada para todos os materiais biológicos (Sola *et al*., 2012). Os laboratórios de microbiologia podem lançar mão de técnicas simples, porém eficientes, desde a estocagem em água destilada estéril até métodos mais robustos e que permitem armazenamento por longos períodos de tempo, como a liofilização. Sendo assim, a escolha pelas técnicas deve passar não só pelas exigências do micro-organismo a ser estudado, mas também pelos custos com equipamentos e materiais assim como pela frequência de manuseio do acervo. No entanto, por medidas de segurança e para evitar a perda da estirpe, é aconselhável armazenar espécimes biológicos, utilizando pelo menos duas metodologias distintas, sendo uma delas a criopreservação ou a liofilização, pois apresentam menor risco de mutações do micro-organismo além de serem metodologias de preservação de longos períodos (OECD, 2007).

Os diferentes métodos de conservação de células microbianas podem ser separados em curto, médio ou de longo tempo de estocagem.

1.9.1. Métodos de curto tempo de estocagem

Subcultivo contínuo

O subcultivo contínuo é um método simples e tradicional utilizado há décadas nos laboratórios de microbiologia. O método consiste na inoculação da estirpe microbiana em meio de cultura adequado ao seu crescimento, podendo ser utilizado meio sólido ou líquido. Posterior ao seu crescimento é aconselhável o armazenamento em refrigeração entre 4 e 8°C para induzir a redução do metabolismo. Este método, apesar de simples e aplicável à maioria dos micro-organismos, possui muitas desvantagens. Uma delas é a necessidade de repique sucessivo que pode ser bastante variável (Passador *et al*., 2010). Além disso, ainda que armazenado sob refrigeração, os espécimes continuam a se multiplicar, mesmo que lentamente, o que pode ocasionar comprometimento da estabilidade genética e alterações genotípicas e/ou fenotípicas, como observado por Santos e colaboradores (2002) em relação à diminuição da produção de micotoxinas pelo fungo *Penicillium expansum* quando armazenado pelo método de subcultivo por longos períodos. Sendo assim, é necessária também a verificação periódica das características morfológicas e até moleculares dos isolados. Principalmente quando armazenados sob refrigeração, os meios de cultura podem sofrer dessecamento, devido à baixa umidade no interior das geladeiras; ou esgotamento dos nutrientes (Murray, 2003). Dessa forma, esse é mais um fator a ser observado para avaliar a periodicidade dos repiques. Além disso, a manipulação frequente do acervo pode levar a contaminações das culturas e/ou etiquetagem incorreta por acidente, ocasionando perda de estirpes importantes. Mesmo que seja em caráter temporário, esse método ainda é bastante disseminado nos laboratórios de microbiologia, principalmente pelo fato da facilidade de recuperação do espécime.

1.9.2. Métodos de médio tempo de estocagem

Imersão em óleo mineral

Esse método de conservação consiste numa alternativa simples e eficiente de prolongar o tempo de estocagem de muitos micro-organismos mantidos sob o método de subcultivo contínuo. Essa técnica consiste na adição de uma camada de óleo mineral estéril no frasco de estoque da cultura de interesse (Sherf, 1943). A camada de óleo tem o objetivo de limitar o oxigênio disponível, reduzindo, assim, o metabolismo do espécime (Figura 1.8). Além disso, são recomendados óleos de boa qualidade e pureza, sendo a vaselina e a parafina os mais utilizados para

este fim. O tempo de estocagem através da imersão em óleo pode ser prolongado por muitos anos, como visto por Smith e Onions (1983), onde fungos do gênero *Fusarium* continuaram viáveis após 32 anos mantidos em culturas submersas em óleo mineral. No entanto, esse tipo de preservação possui as mesmas desvantagens que o repique sucessivo, prolongando apenas a longevidade de armazenamento da cultura.

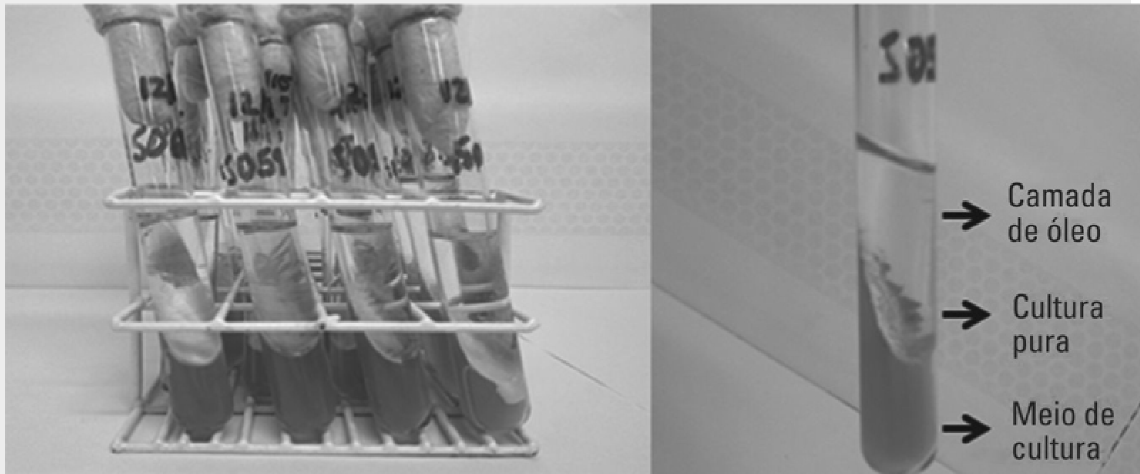


FIGURA 1.8 Imagem demonstrando culturas microbianas armazenadas com o método de imersão em óleo mineral.

Água destilada

O método de conservação em água destilada ou método de Castellani consiste na transferência de culturas microbianas crescidas para frascos contendo água destilada estéril (Castellani, 1939) como demonstrado nas Figuras 1.9 e 1.10. A transferência pode se dar através da preparação de suspensão de células ou de blocos de ágar contendo crescimento recente da colônia. É indicado, nesse caso, selar o frasco com membrana do tipo parafilme para evitar contaminação e abertura acidental do mesmo. Essa técnica tem como objetivo a redução do metabolismo do micro-organismo devido à restrição de fontes nutritivas. O método de Castellani é uma forma simples de preservação de culturas microbianas que apresenta baixo custo e fácil reprodutibilidade. Estudos como os de Liao e Shollenberger (2003) e Neufeld e Oliveira (2008) demonstram que essa técnica permite a manutenção da viabilidade de diversas espécies de bactérias e fungos por até 16 anos.

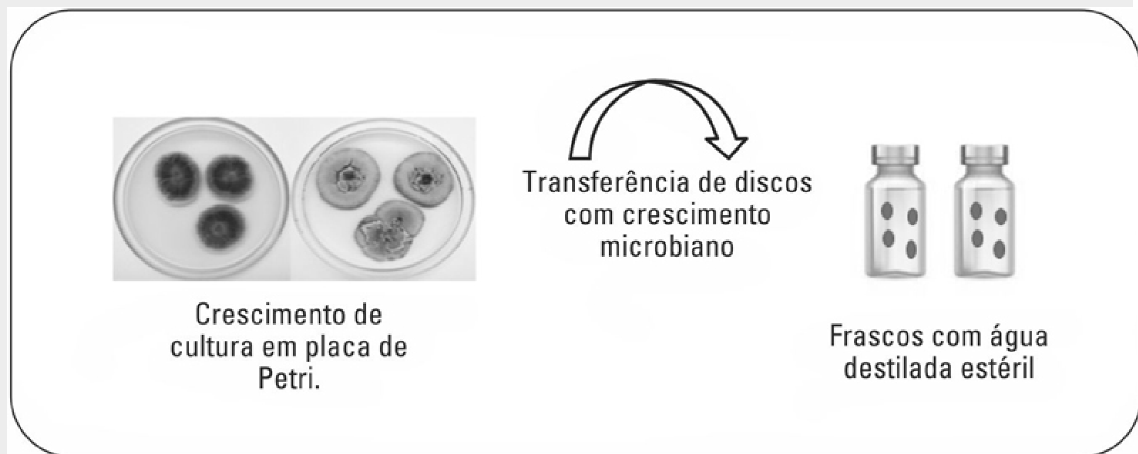


FIGURA 1.9 **Esquema demonstrativo do princípio do método de conservação de Castellani.**

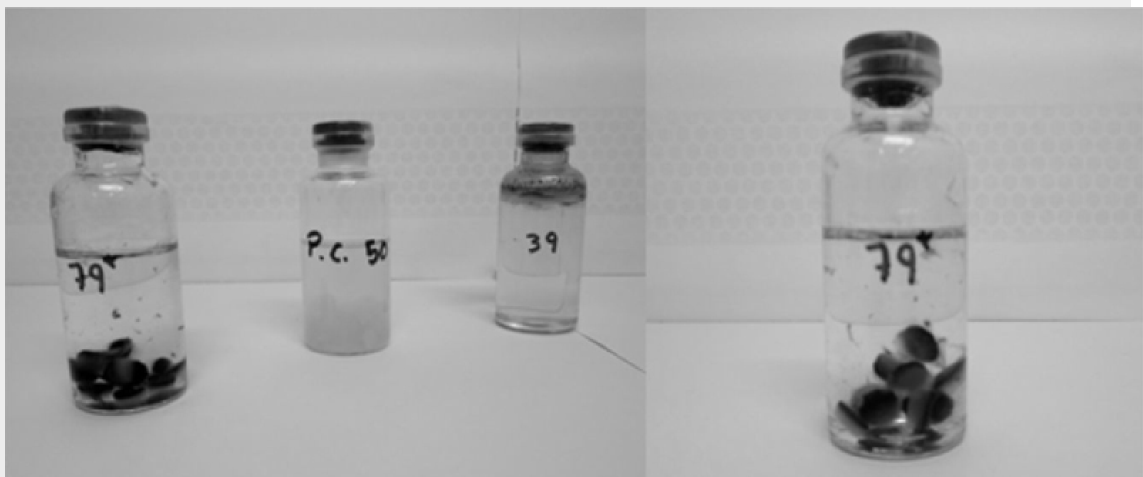


FIGURA 1.10 **Imagem de frascos com blocos de ágar a partir do crescimento microbiano (conservação pelo método de Castellani).**

1.9.3. Métodos de longo tempo de estocagem

Liofilização

A liofilização consiste na preservação de amostras biológicas por meio da remoção de água através da sublimação em condições de baixa temperatura e pressão reduzida (vácuo) por um aparelho denominado liofilizador (Figura 1.11). A remoção do vapor d'água das amostras

biológicas tem o objetivo de retardar o metabolismo do micro-organismo, mantendo assim, sua viabilidade por longos períodos de tempo. No entanto, para a realização da liofilização, o espécime precisa ser previamente congelado, o que pode acarretar danos à membrana celular devido à formação de cristais de gelo, reduzindo a sua sobrevivência e a viabilidade após o processo (Morgan *et al*., 2006). Sendo assim, o uso de crioprotetores é indicado para minimizar o congelamento intracelular, podendo ser adicionados no meio de cultura durante o desenvolvimento do micro-organismo (Kets e de Bonts, 1994; Hoefman *et al*., 2012), antes do congelamento ou da secagem (Hubálek, 2003). Crioprotetores são moléculas com baixo peso molecular, alta solubilidade em meio aquoso e baixa toxicidade celular (Fuller, 2004). São compostos com características que podem alterar o meio reduzindo o ponto crioscópico da solução, ou realizar ligações com as moléculas de água ocasionando a redução da formação de cristais de gelo durante o congelamento (Hubálek, 2003). Apesar disso, alguns crioprotetores podem ser tóxicos para uma parcela de micro-organismos e seu uso vai depender do espécime em questão. Porém, compostos como dimetilsulfóxido (DMSO - $(CH_3)_2SO$), glicerol, soro bovino, leite desnatado, sorbitol, sacarose, glucose, extrato de levedura, extrato de malte e polivinilporrovidona (PVP) são capazes de proteger uma gama de espécies (Hubálek, 2003). A liofilização é a metodologia mais utilizada como padrão em indústrias de biotecnologia e coleções de cultura, pois é capaz de garantir a viabilidade de espécimes estáveis por mais de 20 anos (Miyamoto-Shinohara *et al*., 2006). Outros benefícios da manutenção de espécimes liofilizados é a possibilidade de transportar e armazenar em temperatura ambiente, além da manutenção sem necessidade de transferências periódicas e disponibilidade de espaço amplo para o armazenamento das ampolas (Pegg, 1976). No entanto, é importante frisar que há necessidade de ajuste dos protocolos de liofilização para cada micro-organismo, já que diversos fatores influenciam na taxa de sobrevivência e viabilidade do espécime, como: fase de crescimento em que o micro-organismo está no momento em que é aplicada a metodologia, concentração de células em suspensão (de preferência superior a 10^7 ml^{-1}, já que muitas células morrem durante o processo) e composição do meio (Morgan *et al*., 2006).



FIGURA 1.11 **Imagem de um liofilizador utilizado em laboratório de microbiologia.**

Criopreservação

A criopreservação consiste na manutenção de material biológico sob temperaturas baixas (-20°C a -80°C em freezers e ultrafreezers) e ultrabaixas (-150°C a -196°C em nitrogênio líquido), como demonstrado na Figura 1.12. Assim como a liofilização, essa técnica tem como objetivo reduzir ao máximo o metabolismo do micro-organismo, onde as amostras são gradativamente resfriadas. Durante o resfriamento gradativo é que, justamente, verifica-se o ponto crítico da metodologia, pois são em faixas intermediárias que ocorrem alterações biofísicas que podem culminar na formação de cristais intracelulares, inviabilizando as células em suspensão (Fuller, 2004). Desse modo, a utilização de crioprotetores é imprescindível para o sucesso dessa técnica. Como dito anteriormente, os crioprotetores têm a função de proteger o micro-organismo contra danos causados durante o congelamento e descongelamento das amostras biológicas. O armazenamento eficiente dos espécimes em baixas temperaturas pode ser comprometido devido à possibilidade de oscilações na temperatura dos freezers; no entanto, os sistemas de armazenamento por nitrogênio líquido garantem certa constância em relação a essa questão (Sola *et al*., 2012). Assim como a liofilização, a criopreservação possui uma boa eficiência no que diz respeito à produção de espécimes estáveis e com alta taxa de sobrevivência. Porém, possuem desvantagem no que tange ao transporte das amostras, pois as mesmas precisam ser mantidas armazenadas em baixa temperatura até mesmo durante o deslocamento. Apesar disso, algumas espécies de micro-organismos são sensíveis à liofilização mesmo com a utilização de crioprotetores, sendo a criopreservação a melhor forma de preservação a longo prazo. Hwang (1966) relatou que a melhor maneira de preservação de alguns fungos da coleção de cultura ATCC (American Type Culture Collection) era a utilização de nitrogênio líquido, permitindo a recuperação das estirpes estáveis após 5 anos, assim como Kitamoto e colaboradores (2002), que constataram que fungos pertencentes aos diferentes filos permaneceram viáveis e sem alteração nas suas estruturas através da criopreservação em freezers -80°C.



FIGURA 1.12 Imagem de container com nitrogênio líquido utilizado para armazenamento de culturas microbianas.

1.10. Coleções de culturas

1.10.1. Das coleções biológicas aos centros de recursos biológicos: breve histórico

O desenvolvimento da Microbiologia na segunda metade do século XIX com uso de meios sólidos (géis) e o surgimento do conceito de cultura pura com Robert Koch, naturalmente, criou a demanda de se conservar em laboratório os organismos isolados. À medida que um número sucessivo de isolamentos era realizado e acumulado nos laboratórios, surgia a necessidade de catalogar, classificar e organizar esta impressionante diversidade que começava a ser descoberta. Não por acaso, nos últimos anos do século XIX e nos primeiros anos do século XX aparecem os primeiros serviços de coleções de culturas: (i) em 1890 pelo Professor Frantisek Král na Universidade Germânica de Praga; (ii) em 1891 no Instituto Pasteur em Paris pelo Dr. Binot; (iii) em 1892 a Micoteca da Universidade Católica de Louvain, na Bélgica; e (iv) em 1904 o Escritório Central de Coleção de Culturas da Real Academia de Ciências e Artes da Holanda (CBS-Knaw).

As coleções de culturas surgem com as principais funções de receber, coletar, catalogar, guardar, conservar e distribuir culturas de micro-organismos para fins educacionais, de controle de qualidade, de pesquisa científica e tecnológica. Os principais focos de pesquisa destas instituições são referentes ao isolamento de micro-organismos, à taxonomia dos grupos de organismos presentes em suas coleções e às tecnologias de preservação das culturas e da manutenção das suas características ao longo do tempo e condições de estocagem. Este panorama permanece por cerca de meio século até que após a Segunda Guerra Mundial começa a haver uma recomendação do depósito das culturas que envolvam pedidos de patente. Em 1949, dois depósitos históricos marcam essa mudança: a cultura de *Streptomyces aureofaciens* NRRL 2209 na Agricultural Research Service Culture Collection (NRRL), vinculada ao Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, e a cultura *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712, na American Type Culture Collection, como parte de patente de produção de aureomicina e cloranfenicol, respectivamente. Embora anteriormente já houvesse depósitos para fins industriais, estes são considerados os dois primeiros depósitos de micro-organismos para fins de patentes que se tem conhecimento (US Congress, 1989).

Nesta época, também, iniciou-se um período de maior cooperação internacional entre as diferentes coleções, principalmente para recuperar os prejuízos sofridos durante a guerra. Uma associação internacional foi formada e, posteriormente, em 1970, tornou-se a atual Federação Mundial de Coleções de Culturas (World Federation of Culture Collections – WFCC). A WFCC é uma comissão da União Internacional das Ciências Biológicas (IUBS) e uma federação dentro da União Internacional das Sociedades de Microbiologia (IUMS). Ela tem entre vários objetivos promover as atividades das coleções e estabelecer uma rede de informações entre estas e seus usuários. Uma dessas iniciativas é a base de dados internacional sobre recursos microbianos, o World Data Centre for Microorganisms (WDCM). Esta base teve seu início com o estabelecimento de uma central de dados na Universidade de Lausanne, Suíça, pelo Professor P. Haudeuroy em 1946, em que os dados das culturas mantidas em diferentes coleções eram agrupados e publicados como boletins (Uruburo, 2003). Na década de 1960, o Professor V. Skeerman da Universidade de Queensland, Austrália, e colaboradores expandiram a iniciativa suíça para uma abrangência global, resultando no WDCM. Em 2015, o WDCM foi subdividido em 4 bases que podem ser acessadas livremente na Web[3]. Destas, o CCINFO (Culture Collections Information Worldwide) contém os dados de 710 coleções de culturas presentes em 71 países que guardam mais de 2,5 milhões de micro-organismos (CCINFO, 2015).

O Brasil é o país que possui o maior número de coleções de cultura biológica registradas no WFCC/CCINFO. Sendo muitas com grande relevância para fins de pesquisa e desenvolvimento tecnológico. Ao todo, são 75 coleções de cultura reconhecidas. Dentre elas, podemos citar a Micoteca da Universidade Federal de Pernambuco (Registro WFCC: URM864), fundada em 1954 pelo Prof. Augusto Chaves Batista, que conta atualmente com um acervo de 8000 registros e 20.000 amostras de fungos preservadas[4]. Outra coleção de relevância é a Coleção Brasileira de Micro-organismos do Ambiente e da Indústria (CBMAI), sediado no CPQBA/UNICAMP, em Campinas (SP). Atualmente o CBMAI conta com uma vasta coleção microbiana contendo cerca de 1.200 amostras depositadas entre bactérias, actinobactérias, fungos filamentosos, archaeas e culturas referência para fins industriais, além de conter 50.000 clones isolados pela metagenômica. Já a Fundação Andre Tosello, sediada em Campinas (SP), foi fundada em 1971 pelo Professor Andre Tosello, sendo uma instituição privada sem fins lucrativos. Atualmente conta com uma vasta coleção de culturas tropicais totalizando acervo de mais de 7.800

amostras entre fungos, microalgas e bactérias[5]. Outros exemplos de coleções podem ser vistos na Tabela 1.4.

Tabela 1.4

Coleção de Culturas reconhecidas como Autoridades Internacionais de Depósito (IDA), suas especialidades e número aproximado de material biológico depositado com acesso público

Coleção de cultura	Nome oficial	Sigla	Local	Número de registros
Escritório Central de Coleção de Cultura	Centraalbureau voor Schimmelcultures	CBS ou CBS-KNAW	Ultrech (Holanda)	100.000
Coleção de Cultura do Serviço de Pesquisa Agrícola	Northern Regional Research Laboratory ou Agricultral Research Service Culture Collection	NRRL ou ARSCC/USDA	Ilinois (EUA)	99.000
Coleção de Cultura Tipo	American Type Culture Collection	ATCC	Virgínia (EUA)	75.500
Coordenação de Coleção de Culturas	Belgian Coordinated Collections of Microorganisms	BCCM	Gent (Bélgica)	63.000
Coleção de Micro-organismos e Cultura de Células	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen	DSMZ	Braunschweig (Alemanha)	40.000
Centro de Coleção de Culturas Microbiológicas	China General Microbiological Culture Collection Center	CGMCC	Beijing (China)	40.000
Coleção Nacional de Micro-organismos Industriais	Russian National Collection of Industrial Microorganisms	VKPM	Moscou (Rússia)	17.000
Coleção Nacional de Bactérias Industriais, de Alimentos e Marinhas	National Collections of Industrial, Food and Marine Bacteria	NCIMB	Aberdeen (Escócia)	8.500
Coleção de Culturas Tipo	Korean Collection for Type Cultures	KCTC	Daejeon (Coreia)	7.000
Coleção de Leveduras Industriais	Collection of Industrial Yeasts	DBVPG	Perugia (Itália)	6.000
Coleção de Recursos Genéticos Microbianos	Colección Chilena de Recursos Genéticos Microbianos	CChRGM	Chillan (Chile)	2.000
Coleção de Culturas Microbianas	Microbial Culture Collection	MCC	Maharashtra (Índia)	500[*]
Coleção de Cultura do Instituto Nacional de Medidas	The National Measurement Institute	NMI	Melbourne (Austrália)	depósito para patentes

[*] No CCINFO, a coleção MCC apresenta uma lista superior a 150.000 culturas diferentes, entretanto, em seu catálogo on-line, são disponibilizados apenas um número próximo a 500 culturas.

As coleções biológicas têm como procedimento básico receber e fornecer amostras de espécies microbianas ou mesmo de outros organismos (células animais, sementes de plantas, etc.) em condições estáveis, fornecendo a garantia de se estar lidando com uma cultura pura e previamente identificada. Nenhuma coleção pode liberar uma amostra não identificada e em estado fisiológico instável, por questões de segurança e confiabilidade.

As coleções também podem ser consideradas locais de preservação *ex situ* da vida microbiana. Nesta perspectiva, assim como a busca realizada em amostras ambientais, as coleções também são um local de busca de culturas e genes para fins biotecnológicos. No Brasil a lei de Acesso ao Patrimônio Genético (mais detalhes no Item 1.11) regulamenta, através do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético (CGEN), a utilização de micro-organismos para diversos fins. Existe uma diversidade considerável e uma quantidade realmente grande de microrganismos guardados nas coleções. À medida que se forma um maior conhecimento sobre o valor deste material estocado, ele passa a ser reconhecido como de fundamental importância para o desenvolvimento da bioeconomia ou da economia que envolva biotecnologia. A Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico, OCDE, estabelece o conceito dos Centros de Recursos Biológicos, os CRBs (Biological Resource Centre – BRC), e enfatiza esta importância (OECD, 2001). O CRB seria uma evolução do conceito de uma coleção de cultura, um processo que já estava ocorrendo naturalmente nas principais coleções do mundo devido aos avanços científicos e às demandas da comunidade científica, das indústrias e da sociedade. Um CRB inclui os serviços originais de uma coleção de cultura e o expande para coleção de genes e genomas, partes replicáveis (gene, genomas, plasmídeos, vírus, cDNA etc), micro-organismos viáveis mas não cultiváveis, as informações fisiológicas, genéticas e morfológicas relacionadas com a coleção, organizadas em bases de dados, e a bioinformática associada a esses dados. Além de uma gama de serviços referentes a estas ferramentas, que paulatinamente vêm sendo implementadas nas coleções. A acreditação como CRB implica na implementação de condutas de trabalho seguindo guias de boas práticas estabelecidas (OECD, 2007).

1.10.2. Tipos de depósitos e acessos

Os depósitos nas coleções podem ser feitos de diferentes maneiras e existem para atender às necessidades da comunidade científica e das empresas. As variações irão ocorrer nos preços de cada serviço, no escopo da coleção, na distância e na agilidade de atendimento a solicitação. Porém, é aconselhável entrar em contato anteriormente com o curador responsável

da coleção informando o que se pretende enviar. Ele poderá avaliar se o material biológico está dentro do escopo e objetivo da coleção, se há capacidade para recebê-lo, e qual a melhor forma de se efetuar o envio.

Depósito aberto, público ou livre

É o tipo mais comum e antigo de depósito, responde por quase a totalidade do que as coleções guardam. Os custos, para se efetivar o depósito aberto, normalmente se resumem aos de envio. Ele é exigido pelas editoras de artigos científicos para aceitação de manuscrito que envolva descrição de novas espécies. Há uma tendência, cada vez mais comum, de revistas científicas solicitarem este depósito como uma das exigências para aceite do manuscrito para publicação, especialmente em casos onde a reprodutibilidade dos resultados dependa da utilização das culturas microbianas citadas. O acesso a este depósito é livre e somente é cobrada uma taxa de manipulação e envio da cultura. Muitas vezes são praticadas taxas diferenciadas dependendo do solicitante, se universidade ou empresa, por exemplo. Diversas coleções disponibilizam catálogos eletrônicos das culturas deste tipo de depósito. Dados de identificação taxonômica, ano de depósito, local de isolamento, material ou substrato de origem e autor do depósito são bem comuns. Informações sobre a fisiologia ou perfil enzimático são mais raros, mas algumas coleções se esmeram em fornecer essas informações que podem facilitar a pesquisa e escolha da cultura para fins biotecnológicos. Entre estas, a do CBS (Tabela 1.4) possui informações bastante completas sobre a fisiologia de leveduras que podem ser consultadas livremente.

Depósito de patente

Este tipo de depósito foi criado para atender a um dos princípios universais dos processos de análise de patentes que é a sua reprodutibilidade. Em um pedido de patente que para sua repetição seja necessária a utilização de um organismo, e não só a sua descrição, exige-se o depósito do material biológico atrelado ao pedido de patente. Esta exigência foi estabelecida em âmbito internacional pelo Tratado de Budapeste de 1977. Neste tratado também foi criado e definido para fins de patente a figura da Instituição de Depósito, ou seja, qualquer instituição que tenha capacidade de receber, autenticar, conservar e fornecer o material biológico. As coleções de cultura se encaixam nesta definição e também se adaptaram para isso. O Tratado de Budapeste cria também a Autoridade Internacional de Depósito (International Deposit

Authority – IDA) que são as Instituições de Depósito que possuam o status de autoridade internacional para receber depósitos de material biológico. O governo ou escritórios de patentes dos países signatários deste tratado solicitam à Organização Mundial de Propriedade Intelectual (OMPI) (*World Intelectual Property Organization*– WIPO) o reconhecimento desta autoridade para instituições locais. Atualmente, mais de 40 instituições possuem este reconhecimento, sendo a maioria na Europa, algumas estão listadas na Tabela 1.4. Para uma visão completa acesse o documento WIPO, 2015 das instituições reconhecidas como IDAs, os tipos de material biológico que recebem e, inclusive, os valores dos serviços oferecidos.

No Brasil, de acordo com a Lei de Propriedade Intelectual (LPI) de 1996, seguem-se as mesmas exigências do Tratado de Budapeste para depósito de material biológico para patentes, apesar de o país não ser signatário deste tratado. O Instituto Nacional de Propriedade Intelectual (INPI) é o órgão que possui autoridade para reconhecer uma instituição como receptora de depósitos de patentes. Porém, até o momento, por diversas questões, nenhuma coleção de cultura brasileira é reconhecida para tal fim. Os países signatários e muitos não signatários desse tratado reconhecem os depósitos feitos em qualquer instituição que seja uma Autoridade Internacional de Depósito como válidos para os processos locais e internacionais. Atualmente no Brasil, os pedidos de patente deste tipo necessitam obrigatoriamente que estes depósitos sejam feitos em uma destas instituições no exterior. O INPI e o Instituto de Metrologia, Qualidade e Tecnologia (INMETRO) estão realizando esforços na montagem do Centro Brasileiro de Materiais Biológicos, no município de Xerém (RJ) que seria a coleção de cultura no país destinada aos depósitos para fins de patente. A ideia é que esta instituição atenda aos depósitos dos pedidos de patente brasileiros. Porém, devido ao fato de o país não ser signatário, estes depósitos não terão abrangência internacional.

Depósito seguro ou restrito

Neste tipo de depósito a cultura enviada é conservada para acesso futuro e restrito a quem fez o depósito. A coleção faz a manutenção da cultura dentro do padrão de qualidade e mantém absoluto sigilo sobre as informações da cultura e do depósito. A cultura depositada não aparece nos bancos de dados de acesso público das coleções. A propriedade sobre o depósito é do depositário, dele deve partir a autorização para acesso, envio ou destruição da cultura, ou também mudança do tipo ou finalização do depósito. É um serviço pago e pode ser acessado sempre

que necessário mediante solicitação ou autorização do proprietário. Ele é muito utilizado durante as etapas de desenvolvimento de processo para salvaguardar a cultura de interesse.

Banco de cepas

Há uma relativa confusão entre os termos Coleção de Cultura e Banco de Cepas. Um banco de cepas possui a finalidade de fornecer a cultura microbiana para um trabalho específico. Se uma coleção de cultura se dedica, por exemplo, à pesquisa de um determinado grupo de organismos ela forma um banco de cepas a partir das culturas que possui. Se um grupo de pesquisa possui interesse em estudar alguns organismos ele irá formar um banco de cepas desses organismos no laboratório.

Da mesma forma um Banco de Cepas para fins industriais é montado para atender as necessidades de material biológico para a linha de produção dos bioprocessos existentes. É função do banco de cepas receber e enviar linhagens entre laboratórios ou entre o banco de cepas e coleções de cultura, manusear, manter e propagar as linhagens, bem como realizar o controle de qualidade. Para tal, o banco de cepas deve funcionar em um laboratório equipado que permita à equipe realizar estas funções. Este laboratório pode ser da própria indústria ou terceirizado em empresas especializadas.

A principal função do banco de cepas na indústria é fornecer a linhagem para a linha produtiva com estrita qualidade, em termos de pureza, viabilidade, vitalidade, eficiência e quantidade (ver o próximo item). O ideal é possuir um protocolo que inclua alguma metodologia de autenticação da linhagem. Essa metodologia deve permitir de maneira rápida e simples a discriminação da linhagem de contaminações ou de troca de linhagem, e também de alterações. A utilização de meios de cultura diferenciais é sempre uma boa opção. A equipe de profissionais envolvidos nas etapas de cultivo e preparo dos pré-inóculos deve ter conhecimento das características da linhagem nesta metodologia. Ela deve ser utilizada na preparação do pré-inóculo como uma etapa de verificação e também sempre que surja alguma dúvida sobre a linhagem. Qualquer alteração deve ser sistematicamente anotada e se possível correlacionada com dados da área de produção que a utilizou, a fim de se aumentar o conhecimento da equipe sobre a linhagem. Os tubos das linhagens que estejam sob alguma suspeita devem ser separados e será necessário subir um nível até a confirmação de que se está com a cultura

correta, pura e eficiente. Os registros de origem dos tubos talvez sejam os melhores auxiliares para encontrar um tubo problemático.

Um banco de cepa na indústria é montado em níveis ou camadas. Onde o primeiro nível é formado pelo primeiro subcultivo a partir do tubo original recebido pelo banco. Os tubos originais da cultura podem ser fornecidos por uma coleção de cultura, ou pelo setor de pesquisa da empresa ou ainda de outro laboratório de pesquisa através de transferência de tecnologia. A quantidade de níveis e o número de tubos em cada nível são estabelecidos pela demanda do bioprocesso que o banco irá atender.

A definição da quantidade, da concentração e do estado fisiológico das células ou propágulos, bem como a forma do inóculo, deve ser prevista no plano de desenvolvimento do processo. Isso é fundamental para a manutenção da regularidade da produção entre uma batelada e outra (Binot *et al*., 2013). Ela deve ser encarada tão única quanto o processo que irá inocular, porém generalizações nesta etapa são comuns. Isso se faz mais necessário em processos onde há apenas uma ou duas etapas de pré-inóculo na linha de produção, ou em casos onde o inóculo de um fermentador vem diretamente do laboratório. Nestas condições, a falta de padronização na quantidade inicial de células causa variações no rendimento e na produtividade do processo (Webb e Kamat, 1993).

1.11. Legislação de acesso ao patrimônio genético (APG)

A atual legislação brasileira de acesso ao patrimônio genético (APG) e ao conhecimento tradicional associado (CTA) está embasada na Convenção de Diversidade Biológica (CDB). A CDB é um tratado da Organização das Nações Unidas (ONU) e é um dos mais importantes instrumentos internacionais relacionados com a conservação do meio ambiente. A CDB foi estabelecida durante a Conferência das Nações Unidas sobre Meio Ambiente (ECO-92) que aconteceu no Brasil, cidade do Rio de Janeiro em Junho de 1992. Mais de 160 países assinaram esse acordo que passou a vigorar em dezembro de 1993. Esse acordo se baseia em 3 pilares básicos: (i) conservação da diversidade biológica; (ii) uso sustentável da biodiversidade; e (iii) repartição justa e equitativa dos benefícios provenientes da utilização dos recursos genéticos.

Em termos convencionais, o Artigo 2° da CDB – hoje o principal fórum mundial para questões relacionadas com o tema – define biodiversidade ou "diversidade biológica" como "a variabilidade de organismos vivos de todas as origens, compreendendo, dentre outros, os ecossistemas terrestres, marinhos e outros ecossistemas aquáticos e os complexos ecológicos de que fazem parte; compreendendo ainda a diversidade dentro de espécies, entre espécies e de ecossistemas" (www.mma.gov.br/biodiversidade/convencao-da-diversidade-biologica).

A CDB foi e ainda é a base de vários protocolos que vieram depois de 1992, como Protocolo de Cartagena (Biossegurança), Tratado Internacional de Recursos Fitogenéticos para Alimentação e Agricultura, entre inúmeros outros, e mais recentemente o Protocolo de Nagoya, realizado em outubro de 2014[6]. Contudo, antes de o Protocolo de Nagoya ser estabelecido, foi realizada a 10ª Conferência das Partes da Convenção sobre Diversidade Biológica (COP-10), apresentando como um dos principais objetivos o estabelecimento de regras para uma repartição justa e equitativa, entre seus membros, dos benefícios decorrentes da exploração dos recursos genéticos provenientes de plantas, animais e/ou micro-organismos. De forma mais clara, a COP-10 buscou uma partilha mais justa das rendas auferidas através da exploração de processos e produtos comerciais derivados de recursos genéticos. A ratificação desse objetivo veio junto com o Protocolo de Nagoya sobre Acesso a Recursos Genéticos e Repartição de Benefícios decorrentes da sua utilização (ABS – Access and Benefit-Sharing) da

Convenção sobre Diversidade Biológica Justa e Equitativa. O Protocolo de Nagoya sobre a ABS é um acordo internacional suplementar à CDB. Através desse protocolo, fornecedores como, por exemplo, países detentores de grande biodiversidade e usuários de recursos genéticos, por exemplo, as empresas, desfrutarão de maior segurança jurídica e transparência em suas relações, uma vez que o novo protocolo estabelece condições mais previsíveis ao acesso de recursos genéticos e garante a repartição dos seus benefícios com quem os forneceu. Estas regras criaram incentivos para a conservação e uso sustentável de recursos genéticos. As comunidades com conhecimentos tradicionais (comunidades de quilombolas, de pescadores e rendeiras, tribos indígenas etc.) deverão ser um dos principais ganhadores, pois serão remuneradas por empresas que usufruírem dessas informações e capacidades[7].

Até mesmo os países que não ratificaram o Protocolo de Nagoya (como o Brasil) serão obrigados a segui-lo ao negociar com países signatários. Ele também garante que as legislações nacionais sobre biodiversidade sejam respeitadas, ao reforçar a soberania dos países para regulamentar o acesso aos seus recursos genéticos. Isso evita, por exemplo, que uma empresa estrangeira registre como seus os recursos originários do Brasil, como foi o caso do açaí que, de 2003 a 2007, chegou a ser patenteado pela companhia japonesa K.K. Eyela Corporation[8].

De acordo com a pesquisadora da Fiocruz, Manoela da Silva, no Brasil, o Ministério do Meio Ambiente (MMA) é o ponto focal para a implementação da CDB e para regulamentar o acesso ao patrimônio genético (APG) seguindo as normas da CDB estabelecidas na ECO-92. Nos anos 90, o Brasil teve muita dificuldade em se organizar para estabelecer uma legislação ambiental coerente[9]. Essa legislação só veio em 2000, através da Medida Provisória (MP 2.186-16) no então governo do Presidente Fernando Henrique Cardoso, após um escândalo de biopirataria na Floresta Amazônica. Esse escândalo, com proporções globais, foi devido à redação de um contrato de ampla exploração do território da Amazônia, sem controle, feito entre a ONG Bioamazônia (organização social criada com o incentivo do governo) e a empresa suíça multinacional farmacêutica e biotecnológica, a Novartis, com o objetivo de fazer bioprospecção de plantas de interesse comercial da região amazônica. Em função disso, o Brasil acabou sendo um dos primeiros países a organizarem uma legislação sobre acesso ao patrimônio genético, ao conhecimento tradicional associado e à repartição de benefícios, através da publicação da MP 2.186-16 de 2001[10].

Com a intenção de evitar a biopirataria e garantir a repartição de benefícios oriundos do uso desta biodiversidade de forma justa e equitativa, a MP 2.186--16 criou algumas dificuldades para os

pesquisadores nos seguintes setores: (i) Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) sobre a biodiversidade e o conhecimento tradicional associado; (ii) inovação e depósito de patentes; (iii) interferência direta nas colaborações internacionais; e (iv) inadequação da repartição de benefícios justa de forma satisfatória[11].

Após quase 15 anos de amadurecimento do marco legal do APG, a Presidente Dilma Roussef sancionou em 20 de maio de 2015 a Lei da Biodiversidade (Lei 13.123), que dispõe sobre o APG, o CTA e sobre a repartição de benefícios para a conservação e uso sustentável da biodiversidade. Essa nova lei só foi possível após duras críticas impostas pela sociedade civil que buscava uma melhor adequação da legislação (MP 2.186-16), com regras mais claras, menos burocracia e maior simplicidade, capaz de estabelecer um ambiente de tranquilidade e segurança jurídica no meio científico e cultural, facilitando e estimulando estudos de P&D sobre o uso da biodiversidade brasileira e seu potencial econômico e biotecnológico[12].

Ainda segundo Manoela da Silva, com as novas definições do APG, a lei abrange todas as atividades realizadas com a biodiversidade brasileira, incluindo atividades que não estavam contempladas pela MP 2.186-16, incluindo pesquisas relacionadas com taxonomia, descrição de novas espécies, inventários, estudos ecológicos, epidemiologia, entre outras. A nova lei institui o Fundo Nacional para a Repartição de Benefícios (FNRB), de natureza financeira, vinculado ao Ministério do Meio Ambiente, no qual o usuário terá que depositar o valor de 1% ou até 0,1% (por acordo setorial) da renda líquida obtida com a venda do produto acabado ou material reprodutivo oriundo do patrimônio genético nacional. No caso de exploração econômica de produto ou material reprodutivo originado de conhecimento tradicional associado de origem identificável, o depósito no FNRB será de 0,5% da receita líquida anual. Os recursos monetários depositados no FNRB decorrentes da exploração econômica de produto acabado ou de material reprodutivo oriundo de acesso a conhecimento tradicional associado serão destinados, exclusivamente, em benefício dos detentores de conhecimentos tradicionais associados. Quando os recursos monetários depositados no FNRB forem decorrentes da exploração econômica de produto acabado oriundo de acesso a patrimônio genético proveniente de coleções *ex situ*, os mesmos serão parcialmente destinados em benefício dessas coleções[13].

No que diz respeito as penalidades e regularização das pesquisas frente à MP 2.186-16 de 2001, a lei atual está mais flexível, havendo isenção de 100% do pagamento de multas por irregularidades relacionadas com as regras anteriores. Quando se refere ao desenvolvimento de bioproduto

tecnológico, poderá haver uma isenção de até 90% nas multas e o saldo remanescente poderá ser revertido em projetos de licenciamento de produtos livre de ônus; transferência de tecnologias; para conservação e uso sustentável da biodiversidade; distribuição gratuita de produtos em programas de cunho social; etc[14].

Revisão dos conceitos apresentados

- A taxonomia é a área da ciência responsável por classificar e descrever os seres vivos. A unidade básica da taxonomia é a espécie, conceito que vem sofrendo profundas modificações ao longo do tempo, principalmente, em relação aos micro-organismos. A maneira mais aceita, atualmente, para classificar e descrever os micro-organismos é através de abordagens polifásicas que envolvem combinações de informações, como caracteres morfológicos, fisiológicos, bioquímicos e genéticos. Esses métodos são distintos para procariotos e fungos. Apesar da taxonomia de procariotos estar mais bem sistematizada do que dos fungos, ambos estão, ainda, passando por mudanças e se adaptando à luz de novas informações e tecnologias.
- Os micro-organismos são ubiquitários no planeta Terra. Além de essenciais à vida na Terra, esses seres podem ser usados para as mais diversas ferramentas biotecnológicas. As alternativas majoritárias de bioprospecção flutuam entre utilizar um micro-organismo de interesse ou na captura de genes de interesse. O solo apresenta um ambiente altamente complexo, e por isso possui grande biodiversidade para bioprospecção.
- O ambiente aquático representa uma fonte enorme de substâncias com potencial biotecnológico, entre elas as bacteriocinas e enzimas como as proteases, amilases e hidrogenases. Os micro-organismos marinhos têm despertado bastante interesse, especialmente aqueles de regiões polares por apresentarem enzimas ativas a baixas temperaturas, com grande potencial para uso industrial.
- Cada grupo microbiano apresenta características fisiológicas que devem ser levadas em consideração no momento de conservação. Muitos fungos não são susceptíveis ao congelamento ou criocongelamento, sendo mais adequado o uso de técnicas como água estéril (Castelani) e óleo mineral. Já para conservar bactérias, o ideal é o congelamento e o criocongelamento na presença de agentes crioprotetores. Para ambos os grupos microbianos, a técnica de liofilização é uma das mais utilizadas e a que permite maior tempo de conservação (cerca de 20 anos). De qualquer maneira, é de extrema

importância enviar amostras biológicas para serem depositadas em coleções de culturas referenciadas nacionais e/ou internacionais, respeitando a legislação vigente.

- A lei de APG permite a regulamentação da pesquisa para todos aqueles que trabalham com material genético *in situ* ou *ex situ*. Baseada na Convenção da Diversidade Biológica, a Lei 13.123 regulamenta a pesquisa no Brasil utilizando vegetais, animais e micro-organismos com potencial para desenvolvimento tecnológico. No caso de exploração tecnológica com formação de produto comercializável, precisa respeitar as determinações colocadas no protocolo de Nagoya sobre a repartição de benefícios de modo equitativo e justo.

Questões

1. Como os seres vivos surgiram na Terra e como se apresenta hoje a distribuição das milhares de espécies na árvore filogenética?
2. Qual a definição de espécie para micro-organismos?
3. Sabe-se que existe uma grande diversidade de micro-organismos no planeta e que sua classificação taxonômica permitiu separá-los em 3 domínios. Desta forma, aponte os critérios de identificação taxonômica e quais as metodologias utilizadas.
4. Qual a definição de bioprospecção e indique possíveis aplicabilidades?
5. Você foi convidado para trabalhar em uma empresa que realiza atividades de bioprospecção no ambiente. Contudo esse convite está vinculado à apresentação de um projeto e a sua contratação só será efetivada se o projeto for coerente. Assim sendo, como você poderia desenvolver esse projeto de bioprospecção que lhe permitisse ser contratado por essa empresa?
6. De que forma podemos conservar os micro-organismos? Apresente para cada grupo microbiano qual a melhor técnica adotada para conservação de células.
7. O que um microrganismo deve apresentar como características para ser selecionado para uso em um bioprocesso? Como funciona o peso econômico nessa escolha?
8. O que motivou o governo brasileiro a criar a MP 2.186-16 e quais seus desdobramentos nos dias atuais?
9. Qual a importância de se depositar micro-organismos em coleções de cultura e qual a importância dos centros de diversidade biológica?

Tópicos para discussão

1. Desenvolver estratégias para bioprospecção de micro-organismos com potencial biotecnológico para degradar: (i) celulose; (ii) proteínas; (iii) amido; (iv) lipídeo; e (v) lignina.
2. De que forma a nova lei de acesso ao patrimônio genético pode ajudar ao desenvolvimento científico e tecnológico do país? Monte grupos de discussão e apresente estratégias que poderiam ser utilizadas para melhorar a Lei 13.123.

Sugestões para pesquisa

1. A biotecnologia microbiana moderna bioprospecta constantemente novos metabólitos, novas enzimas e novos microrganismos com capacidades únicas. Essa busca é frequentemente realizada em locais ermos, isso porque locais ainda não explorados podem, potencialmente, conter novas espécies microbianas ainda não isoladas. Pesquise e discuta os locais extremos em que microrganismos podem ser encontrados, tente incluir em sua pesquisa biotecnologias geradas a partir desses mesmos microrganismos.

Referências

Achtman M, Wagner M. Microbial diversity and the genetic nature of microbial species. *Nature Reviews Microbiology*. 2008;6:431–441.

Alam MW. Microbial species diversity and hydrological effects on their occurrence at Karnaphuli River estuary. *Agricultural Science Research Journal*. 2013;3(6):158–166.

APHA – American Public Health Association. 2005. Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. Standard Methods on line.

Bakkal S, Robinson SM, Riley MA. Bacteriocins of aquatic microorganisms and their potential applications in the seafood industry. In: Carvalho ED, David GS, Silva RJ, eds. *Health and Environment in Aquaculture*. InTech; 2012: doi:10.5772/2462.

Bashan Y. Inoculants of plant growth-promoting bacteria for use in agriculture. *Biotechnology advances*. 1998;16(4):729–770.

Bentley DR. Whole-genome re-sequencing. *Current Opinion Genetics and Development*. 2006;16:545–552.

Besemer K, Singer G, Quince C, Bertuzzo E, Sloan W, Battin TJ. Headwaters are critical reservoirs of microbialdiversity for fluvial networks. *Proceeding of Royal Society B*. 2013;280: 20131760. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1098/rspb.2013.1760.

Bibiana S, Nithyanand P. Screening and evaluation of marine bacteriocins against aquaculture pathogens. *International Journal of PharmTech Research*. 2014;6(5):1482–1489.

Binot P, Sindhu R, Pandey A. Upstream operation of fermentation process. In: Soccol CR, Pandey A, Laroche C, eds. *Fermentation Processes Engineering in the Food Industry*. CRC Press; 2013.

Brito EMS, Piñón-Castillo H, Guyoneaud R, Caretta C, Gutiérrez-Corona JF, Duran R, Reyna-Lopez GE, Nevárez-Moorillón GV, Fahy A, Goñi-Urriza M. Bacterial biodiversity from anthropogenic extreme environments: a hyper-alkaline and hyper-saline industrial residue contaminated by chromium and iron. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013;97(1):369–378: doi:10.1007/s00253-012-3923-5.

Canhos, V.P.; Umino, C.Y.; Manfio, G.P. 2004. Coleções de culturas de micro-organismos. Resumo: Coleções de culturas de micro-organismos. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP. Centro de Referência em Informação Ambiental – CRIA.

Castellani A. Viability of some pathogenic fungi in distilled water. *J Trop Med Hyg*. 1939;42:225–226.

Castillo FYR, González FJA, Garneau P, Díaz FM, Barrera ALG, Harel J. Presence of multi-drug resistant pathogenic *Escherichia coli* in the San Pedro River located in the State of Aguascalientes, Mexico. *Frontiers in Microbiology*. 2013;4:147–216.

CCINFO – Culture Collections Information Worldwide. 2015. Disponível em: http://www.wfcc.info/ccinfo. Acesso em 30 de setembro de 2015.

CGEN – Conselho de Gestão do Patrimônio Genético. 2015 Instituições Credenciadas pelo CGEN. Disponível em: http://www.mma.gov.br/patrimonio-genetico/conselho-de-gestao-do-patrimonio-genetico/instituicoes-fieis-depositarias/credenciamento-das-instituicoes. Acesso em 10 de agosto de 2015.

Chun J, Rainey FA. Integrating genomics into the taxonomy and systematics of the Bacteria and Archaea. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2014;64:316–324: doi:10.1099/ijs.0.054171-0.

Daw MA, Falkiner FR. Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron*. 1996;27(6):467–479.

Desriac F, Defer D, Bourgougnon N, Brillet B, Le Chevalier P, Fleury Y. Bacteriocin as weapons in the marine animal-associated bacteria warfare: Inventory and potential applications as an aquaculture probiotic. *Marine Drugs*. 2010;8:1153–1177.

Doolittle WF, Papke RT. Genomics and the bacterial species problem. *Genome Biology*. 2006;7:116: doi:10.1186/gb-2006-7-9-116.

Drummond JD, Davies-Colley RJ, Stott R, Sukias JP, Nagels JW, Sharp A, Packman AI. Microbial transport, retention, and inactivation in streams – a combined experimental and stochastic modeling approach. *Environmental Science & Technology*. 2015: doi:10.1021/acs.est.5b01414.

Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb J-F, Dougherty BA, Merrick JM, McKenney K, Sutton G, FitzHugh W, Fields C, Gocayne JD, Scott J, Shirley R, Liu L, Glodek A, Kelley JM, Weidman JF, Phillips CA, Spriggs T, Hedblom E, Cotton MD, Utterback TR, Hanna MC, Nguyen DT, Saudek DM, Brandon RC, Fine LD, Fritchman JL, Fuhrmann JL, Geoghagen NSM, Gnehm CL, McDonald LA, Small KV, Fraser CM, Smith HO, Ventert JC. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science*. 1995;269:496–512.

Fuller BJ. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. *CryoLetters*. 2004;25(6):375–388.

Gevers D, Cohan FM, Lawrence JG, Spratt BG, Coenye T, Feil EJ, Stackebrandt E, Van de Peer Y, Vandamme P, Thompson FL, Swings J. Re-evaluating prokaryotic species. *Nature Reviews Microbiology*. 2005;3:733–739.

Godinho VM, Gonçalves VN, Santiago IF, Figueredo HM, Vitoreli G, Schaefer CEGR, Barbosa EC, Oliveira JG, Alves TMA, Zani CL, Junior PAS, Murta SMF, Romanha AJ, Kroon EG, Cantrell CL, Wedge DE, Duke SO, Ali A, Rosa CA, Rosa LH. Diversity and bioprospection of fungal community present in oligotrophic soil of continental Antarctica. *Extremophiles: life under extreme conditions*. 2015;19(3):585–596: doi:10.1007/s00792-015-0741-6.

Green JL, Holmes AJ, Westoby M, Oliver L, Briscoe D, Dangerfield M, Gillings M, Beattie AJ. Spatial scaling of microbial eukaryote diversity. *Nature*. 2004;432:747–750.

Grigoriev IV, Nikitin R, Haridas S, Kuo A, Ohm R, Otillar R, Riley R, Salamov A, Zhao X, Korzeniewski F, Smirnova T, Nordberg H, Dubchak I, Shabalov I. MycoCosm portal: gearing up for 1000 fungal genomes. *Nucleic Acids Research*. 2014;42(1):D699–704: doi:10.1093/nar/gkt1183.

Handelsman J. Metagenomics: Application of genomics to uncultured microorganisms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 2004;68(4):669–685.

Hawksworth DL. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*. 1991;95:641–655.

Hawksworth DL. Fungal diversity and its implications for genetic resource collections. *Studies in Mycology*. 2004;50:9–18.

Hawksworth DL. Global species numbers of fungi: are tropical studies and molecular approaches contributing to a more robust estimate? *Biodiversity Conservation*. 2012;21:2425–2433.

Hedges JI, Oades JM. Comparative organic geochemistries of soils and marine sediments. *Org Geochem*. 1997;27(7/8):319–361.

Henz SR, Huson DH, Auch AF, Nieselt-Struwe K, Schuster SC. Whole-genome prokaryotic phylogeny. *Bioinformatics*. 2005;21:2329–2335.

Hibbett DS, et al. A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. *Mycological Research*. 2007;III:509–547.

Hibbett DS, Taylor JW. Fungal systematics: is a new age of enlightenment at hand? *Nature Reviews Microbiology*. 2013;11:129–133.

Hillis DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Review of Biology*. 1991;66(4):411–453.

Hoefman, S.; Van Hoorde, K.; Boon, N.; Vandamme, P.; De Vos, P. or revival: long-term preservation induces a reversible viable but non-culturable state in methane-oxidizing bacteria. PLoS ONE 7(4): 1-9. doi:10.1371/journal.pone.0034196Survival.

Horton TR, Bruns TD. The molecular revolution in ectomycorrhizal ecology: peeking into the black-box. *Molecular Ecology*. 2001;10:1855–1871.

Hubálek Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. *Cryobiology*. 2003;46:205–229.

Hwang SW. Long-term preservation of fungus cultures with liquid nitrogen refrigeration. *Appl Microbiol*. 1966;14:784–788.

Izawa MRM, Banerjee NR, Flemming RL, Bridge NJ, Schultz C. Basaltic glass as a habitat for microbial life: Implications for astrobiology and planetary exploration. *Planetary and Space Science*. 2010;58(4):583–591: doi:10.1016/j.pss.2009.09.014.

Kang Y, Lee S, Lee J. Development of a selective medium for the fungal pathogen *Cylindrocarpon destructans* using radicicol. *The Plant Pathology Journal*. 2014;30(4):432–436.

Kets EPW, de Bont JAM. Protective effect of betaine on survival of *Lactobacillus plantarum* subjected to drying. *FEMS Microbiology Letters*. 1994;116:251–256.

Killham K. *Soil Ecology*. Cambridge: Cambridge University Press; 1994: 242 p.

Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA. *Dictionary of the Fungi*. 10th ed Wallingford, UK: CABI Publishing; 2008.

Kirsop B. Culture collections - their services to biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 1983;1:4–8.

Kitamoto Y, Suzuki A, Shimada S, Yamanaka K. A new method for the preservation of fungus stock cultures by deep-freezing. *Mycoscience*. 2002;43(2):143–149.

Konstantinidis KT, Rosselló-Móra Ramon. Classifying the uncultivated microbial majority: a place for metagenomic data in the *Candidatus* proposal. *Systematic and Applied Microbiology*. 2015: http://dx.doi.org/doi:10.1016/j.syapm.2015.01.001.

Land M, et al. Insights from 20 years of bacterial genome sequencing. *Functional & Integrative Genomics*. 2015;15:141–161.

Lazcano A, Fox GE, Oró J. Life before DNA: the origin and early evolution of early Archean cells. In: Mortlock RP, ed. *The Evolution of Metabolic Function*. Boca Raton: CRC; 1992:237–295.

Lawrence JG. Gene transfer in Bacteria: speciation without species? *Theoretical Population Biology*. 2002;61:449–460: doi:10.1006/tpbi.2002.1587.

Leary, D. 2008. UNU-IAS – Report. Bioprospecting in the artic. United Nations University, Institute of Advanced Studies.

Liao CH, Shollenberger LM. Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline. *Letters in Applied Microbiology*. 2003;37(1):45–50.

McLaughlin DJ, Hibbett DS, Lutzoni F, Spatafora JW, Vilgalys R. The search for the fungal tree of life. *Trends in Microbiology*. 2009;17(11):488–497.

Madigan, M.T.; Martinko, J.M.; Parker, J. 2004. Microbiologia de Brock. Editado por Braga M.J.; Trimer R. São Paulo: Prentice Hall. p. 325-29.

Margulies M, et al. Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature*. 2005;437:376–380.

Mayr E. *Systematics and the origin of species*. New York: Columbia University Press; 1942.

Mayr E. *Isto é biologia – A ciência do mundo vivo*. São Paulo: Companhia das Letras; 2008.

Medini, D.; Serruto, D.; Parkhill, J.; Relman, D.A.; Donati, C.; Moxon, R.; Falkow, S.; Rappuoli, R. Microbiology in the post-genomic era. Nature Reviews Microbiology, 6: 2000, 419-30.

Miyamoto-Shinohara Y, Sukenobe J, Imaizumi T, Nakahara T. Survival curves for microbial species stored by freeze-drying. *Cryobiology*. 2006;52:27–32.

Morgan CA, Herman N, White PA, Vesey G. Preservation of microorganisms by drying – a review. *Journal of Microbiological Methods*. 2006;66:183–193.

Murray PR, Baron EJ, Jorgensen JH, Pfaller MA, Yolken RH. *Manual of clinical microbiology*. 8th ed Washington DC: ASM Press; 2003: 2113.

Nannipieri P, Ascher J, Ceccherini MT, Landi L, Pietramellara G, Renella G. Microbial diversity and soil functions. *European Journal of Soil Science*. 2003;54:655–670: doi:10.1046/j. 1365-2389.2003.00556.x.

Nes, I.F. 2011. History, current knowledge, and future directions on bacteriocin research in lactic acid bacteria. In : Drider, D., Rebuffat, S., Springer, editors. Prokaryotic antimicrobial Peptides: from genes to applications.

Neufeld PM, Oliveira PC. Preservação de dermatófitos pela técnica da água destilada estéril. *Revista Brasileira Análises Clínicas*. 2008;40:167–169.

Nikolaki, S.; Tsiamis, G. 2013. Microbial diversity in the era of omic technologies. BioMed Research International: Article ID 958719. http://dx.doi.org/10.1155/2013/958719.

Nilsson RH, Abarenkov K, Veldre V, Nylinder S, Wit P, Brosché S, Alfredsson JF, Ryberg M, Kristiansson E. An open source chimera checker for the fungal ITS region. *Molecular Ecology Resources*. 2010;10:1076–1081.

NJDEP – New Jersey Department of Environmental Protection. 2005. Field Sampling Procedures Manual. Chapter 6 Sample Collection. Disponível em: http://www.nj.gov/dep/srp/guidance/fspm/. Acesso em 27 de agosto de 2015.

O'Brien HE, Parrent JL, Jackson JA, Moncalvo J, Vilgalys R. Fungal community analysis by large-scale sequencing of environmental samples. *Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71(9):5544–5550.

O'Connor EM, Shand RF. Halocins and sulfolobicins: the emerging story of archaeal protein and peptide antibiotics. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2002;28(1):23–31.

OECD – Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). 2001. Biological Resource Centres: Underpinning the future of life science and biotechnology. Disponível em: www.olis.oecd.org.

OECD – Organization for Economic Co-operation and Development. 2007. Guidance of Operation of Biological Resource Centres (BRCs). Disponível em: www.olis.oecd.org.

Passador MM, Pires GCC, Finatti D, Aparecido CC, Figueiredo MB. Manutenção da viabilidade e patogenicidade de culturas mantidas na micoteca "Mário Barreto Figueiredo". Biológico. *São Paulo*. 2010;72:51–55.

Paulse AN, Jackson VA, Khan S, Khan W. Isolation and identification of bacterial pollutants from the Berg and Plankenburg Rivers in the Western Cape. *South Africa. Water SA*. 2012;38(5):819–824.

Pegg DE. Long-term preservation of cells and tissues: a review. *Journal of Clinical Pathology*. 1976;29(4):271–285.

Perrone G, Stea G, Epifani F, Varga J, Frisvad JC, Samson RA. *Aspergillus niger* contains the cryptic phylogenetic species *A. Awamori. Fungal Biology*. 2011;115:1138–1150: doi:10.1016/j.funbio.2011.07.008.

Prenafeta-Boldú FX, Summerbell R, Sybren de Hoog G. Fungi growing on aromatic hydrocarbons: biotechnology's unexpected encounter with biohazard? *FEMS microbiology reviews*. 2006;30(1):109–130: doi:10.1111/j.1574-6976.2005.00007.x.

Ramasamy D, Mishra AK, Lagier J, Padhmanabhan R, Rossi M, Sentausa E, Raoult D, Fournier P. A polyphasic strategy incorporating genomic data for the taxonomic description of novel bacterial species. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2014;64:384–391.

Rathore S, Desai PM, Liew CV, Chan LW, Heng PWS. Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*. 2013;116:369–381.

Reddy PVV, Rao SSSN, Pratibha MS, Sailaja B, Kavya B, Manorama RR, Singh SM, Srinivas TNR, Shivaji S. Bacterial diversity and bioprospecting for cold-active enzymes from culturable bacteria associated with sediment from a melt water stream of Midtre Lovenbreen glacier, an Arctic glacier. *Research in Microbiology*. 2009;160:538–546.

Richter M, Rosselló-Móra R. Shifting the genomic gold standard for the prokaryotic species definition. *PNAS*. 2009;106:19126–19131.

Rivkina E, Laurinavichius K, McGrath J, Tiedje J, Shcherbakova V, Gilichinsky D. Microbial life in permafrost. *Advances in Space Research*. 2004;33(8):1215–1221: doi:10.1016/j.asr. 2003.06.024.

Rillig MC, Mummey DL. Mycorrhizas and soil structure. *New Phytol.* 2006;171:41–53.

Rosselló-Móra R, Amann R. The species concept for prokaryotes. *FEMS Microbiology Reviews*. 2001;25:39–67.

Rosselló-Móra R, Amann R. Past and future species definitions for Bacteria and Archaea. *Systematic and Applied Microbiology*. 2015;38:209–216.

Santos IM, Abrunhosa L, Venâncio A, Lima N. The effect of culture preservation techniques on patulin and citrinin production by *Penicillium expansum* Link. *Letters in Applied Microbiology*. 2002;35(4):272–275.

Schoch CL, Seifert KA, Huhndorf S, Robert V, Spouge JL, Levesque CA, Chen W. Fungal Barcoding Consortium Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for fungi. *PNAS*. 2012;109:6241–6246.

Sharma R, Polkade AV, Shouche YS. 'Species concept' in microbial taxonomy and systematics. *Current Science*. 2015;108(10):1804–1814.

Shenoy BD, Jeewon R, Hyde KD. Impact of DNA sequence-data on the taxonomy of anamorphic fungi. *Fungal Diversity*. 2007;26:1–54.

Sherf AF. A method to maintaining *Phytomonas sepedonica* in culture for long period without transfer. *Phytopathology*. 1943;33:332–333.

Siddique S, Syed Q, Adnan A, Qureshi FA. Isolation, characterization and selection of avermectin-producing *Streptomyces avermitilis* strains from soil samples. *Jundishapur Journal of Microbiology*. 2014;7(6):e10366: doi:10.5812/jjm.10366.

Singh P, Raghukumar C, Meena RM, Verma P, Shouche Y. Fungal diversity in deep-sea sediments revealed by culture-dependent and culture-independent approaches. *Fungal Ecology*. 2012;5:543–553.

Smih D, McCluskey K, Stackerbrandt E. Investment into future of microbial resources: culture collection funding models and BRC business plans for biological resources centers. *SpringerPlus*. 2014;3:81.

Smith D, Onions AHS. A comparison of some preservation techniques for fungi. *Trans Br Mycol Soc*. 1983;81:535–540.

Smykla J, Drewnik M, Szarek-Gwiazda E, Hii YS, Knap W, Emslie SD. Variation in the characteristics and development of soils at Edmonson Point due to abiotic and biotic factors, northern Victoria Land, Antarctica. *Catena*. 2015;132:56–67: doi:10.1016/j.catena.2015.04.011.

Sola MC, de Oliveira AP, Feistel JC, Rezende CSM. Manutenção de micro-organismos: conservação e viabilidade. *Enciclopédia Biosfera*. 2012;8:1398–1419.

Solanki, H.K.; Pawar, D.D.; Shah, D.A.; Prajapati, V.D.; Jani, G.K.; Mulla, A.M.; Thakar, P.M. 2013. Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent, 2013: article ID 620719, 21 p.

Stephens JHG, Rask HM. Inoculant production and formulation. *Field Crops Research*. 2000;65(2–3):249–258: doi:10.1016/S0378-4290(99)00090-8.

Stackebrandt E, Frederiksen W, Garrity GM, Grimont PAD, Kämpfer P, Maiden MCJ, Nesme X, Rosselló-Morá R, Swings J, Trüper HG, Vauterin L, Ward AC, Whitman WB. Report of the ad hoc committee for the re-evaluation of the species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002;52:1043–1047.

Sullivan CB, Diggle MA, Clarke SC. Multilocus sequence typing: data analysis in clinical microbiology and public health. *Molecular Biotechnology*. 2005;29:245–254.

Taylor JW, Jacobson DJ, Kroken S, Kasuga T, Geiser DM, Hibbett DS, Fisher MC. Phylogenetic species recognition and species concepts in fungi. *Fungal Genetics and Biology*. 2000;31:21–32.

Taylor JW, Fisher MC. Fungal multilocus sequence typing - it's not just for bacteria. *Current Opinion in Microbiology*. 2003;6:351–356.

Taylor A. Recent advances in our understanding of fungal ecology. *Coolia*. 2008;52:197–212.

Theobald, Douglas L. A formal test of the theory of universal common ancestry. *Nature*. 2010;465(7295):219–222: doi:10.1038/nature09014.

Tiedje JM, Asuming-Brempong S, Nusslein K, Marsh TL, Flynn SJ. Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*. 1999;13:109–122.

Timmermans, K. 2001. TRIPS, CBD and tradicional medicines: Concepts and questions, World Health Organization, Geneva, 2001, NA-DFC, Report of an ASEAN Workshop on the TRIPS Agreement and Traditional Medicine, Jakarta, 13-15 February 2001. Disponível em: www.who.int/medicinedocs/end/Jh299e/. Acesso em 27 de agosto de 2015.

Tindall BJ, Rosselló-Móra R, Busse HJ, Ludwig W, Kampfer P. Notes on the characterization of prokaryote strains for taxonomic purposes. *International Journal of Systematic and Evolucionary Microbiology*. 2010;60:249–266.

Torsvik VL, Sørheim R, Goksoyr J. Total bacterial diver- sity in soil and sediment communities – a review. *Journal of Industrial Microbiology*. 1996;17:170–178.

Uruburo F. History and services of culture collections. *Int Microbiol*. 2003;6:101–103.

U.S. Congress. 1989. Office of Technology Assessment, Advisory Panel, New Developments in Biotechnology: Patenting Life, OTA-BA-370, Washington D.C, U.S. Government Printing Office.

Venter, J.C; Remington, K.; Heidelberg, J.; Halpern, A.; Rusch, D.; Eisen, J.; Wu, D.; Paulsen, I.; Nelseon, K,; Nelson, W.; Fouts, D.; Levy, S.; Knap, A.; Lomas, M.; Nealson, K.; White, O.; Peterson, J.; Hoffman, J.; Parsons, R.; Baden-Tillson, H.; Pfannkoch, C.; Rogers, Y.; Smith, H. 2004. Environmental genome shotgun sequencing of the Sargasso Sea Science, 304(5667): 66-74.

Vermelho AB, Pereira AF, Coelho RRR, Souto-Padrón T. *Práticas de Microbiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan; 2006: 239 p.

Vester KJ, Glaring MA, Stougaard P. Discovery of novel enzymes with industrial potential from a cold and alkaline environment by a combination of functional metagenomics and culturing. *Microbial Cell Factories*. 2014;13(72): doi:10.1186/1475-2859-13-72.

Webb C, Kamat SP. Improving fermentation consistency through better inoculum preparation. *World J Microbiol Biotechnol*. 1993;9:308–312.

White TJ, Burns T, Lee S, Taylor J. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ, eds. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*. San Diego: Academic Press; 1990:315–322.

Wickramasinghe C. The universe: a cryogenic habitat for microbial life. *Cryobiology*. 2004;48(2):113–125: doi:10.1016/j.cryobiol.2004.03.001.

WIPO – World Intellectual Property Organization. 2015. Depository institutions having acquired the status of international depositary authority under the Budapest Treaty. Disponível em: http://www.wipo.int/export/sites/www/treaties/en/registration/budapest/pdf/ida.pdf. Acesso em 15 de agosto de 2015.

Wösten HAB, van Wetter MA, Lugones LG, van der Mei HC, Busscher HJ, Wessels JGH. How a fungus escapes the water to grow into air. *Curr. Biol.* 1999;9:85–88.

Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glöckner FO, Ludwig W, Schleifer K, Whitman WB, Euzéby J, Amann R, Rosselló-Móra R. Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nature Reviews Microbiology*. 2014;12:635–646.

Yazdani Foshtomi M, Braeckman U, Derycke S, Sapp M, van Gansbeke D, Sabbe K, Willems A, Vincx M, Vanaverbeke J. The link between microbial diversity and nitrogen cycling in marine sediments is modulated by macrofaunal bioturbation. *PLoS ONE*. 2015;10(6):e0130116: doi:10.1371/journal.pone.0130116.

Yu Y, Li HR, Zeng YX, Chen B. Bacterial diversity and bioprospecting for cold-active hydrolytic enzymes from culturable bacteria associated with sediment from Nella Fjord. *Eastern Antarctica. Marine Drugs*. 2011;9:184–195.

Zhou J. Microarrays for bacterial detection and microbial community analysis. *Curr Opin Microbiol*. 2003;6:288–294.

---

[1] http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/

[2] https://rdp.cme.msu.edu/

[3] http://www.wdcm.org/

[4] http://www.ufpe.br/micoteca.

[5] http://fat.org.br

[6] http://www.mma.gov.br/biodiversidade/convencao-da-diversidade-biologica.

[7] http://www.oeco.org.br/dicionario-ambiental/28740-o-que-e-o-protocolo-de-nagoia.

[8] http://www.oeco.org.br/dicionario-ambiental/28740-o-que-e-o-protocolo-de-nagoia.

[9] http://www.mma.gov.br/biodiversidade/convencao-da-diversidade-biologica.

[10] http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/acesso-ao-patrimonio-genetico.

[11] http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/acesso-ao-patrimonio-genetico.

[12] http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/acesso-ao-patrimonio-genetico.

[13] http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/acesso-ao-patrimonio-genetico.

[14] http://portal.fiocruz.br/pt-br/content/acesso-ao-patrimonio-genetico.

CAPÍTULO

2

Biologia e Biotecnologia de Procariotos

Diogo de Azevedo Jurelevicius

Renata Estebanez Vollú

Rodrigo Pires do Nascimento

Rosalie Reed Rodrigues Coelho

Conceitos apresentados neste capítulo

Neste capítulo falaremos sobre as características gerais encontradas nos microrganismos procarióticos, abordando temas como citologia, fisiologia e genética de procariotos. Além disso, destacaremos o uso de alguns grupos de procariotos na biotecnologia.

2.1. Introdução

O objetivo deste capítulo é introduzir um dos principais grupos de microrganismos que são utilizados na biotecnologia: os procariotos. Os procariotos são divididos em dois grandes grupos, as bactérias e as arqueias. Ambos são organismos haploides e unicelulares, sendo que, geralmente, uma única célula pode realizar todas as funções necessárias para o seu ciclo de vida, independente da presença de outras células do mesmo tipo ou de tipos diferentes. Os procariotos são organismos relativamente simples e, em alguns casos, são fáceis de serem manipulados e cultivados em laboratórios. Entretanto, a diversidade de bactérias e arqueias é enorme. Por essas razões, o uso de grupos de procariotos em processos biotecnológicos cresce ano a ano. Neste capítulo, veremos as características básicas de bactérias e arqueias.

2.2. Os procariotos

Os procariotos estão divididos em dois domínios taxonômicos: Bacteria e Archaea. Membros de ambos os domínios são encontrados colonizando os mais variados habitats, incluindo ambientes terrestres, aquáticos e em associação com animais e vegetais. A diversidade dos procariotos é enorme e ainda não se sabe qual é o número exato de espécies existentes na natureza. Embora, recentemente, diferentes estudos, com base em informações moleculares, tenham ajudado a descrever melhor a diversidade dos procariotos, ainda não existe consenso sobre o número de filos de grupos de procariotos já conhecidos. Por exemplo, banco de dados de genes que codificam o RNA ribossomal 16S (RNAr 16S), que é o marcador molecular mais utilizado para classificação taxonômica de procariotos, como os banco de dados "Greengenes" (McDonald *et al.*, 2011; http://greengenes.lbl.gov/) e "Silva" (Quast *et al.*, 2013; http://www.arb-silva.de), divergem quanto ao número de filos de Bacteria e Archaea existentes. Entretanto, ambos contabilizam mais de 50 filos de procariotos (a grande maioria desses filos é formada por "filos candidatos" compostos por grupos nunca cultivados em laboratório). Enquanto isso, o projeto de taxonomia "All living tree project" (Yarza *et al.*, 2010) contabiliza 29 filos diferentes de procariotos, sendo 27 filos do domínio Bacteria e 2 filos do domínio Archaea. Assim, novos métodos vêm sendo desenvolvidos para gerar novas sequências no genoma e facilitar a identificação dos organismos e suas capacidades metabólicas. Hug et al. (2016) utilizaram novos dados genômicos de mais de 1.000 organismos não cultivados e pouco conhecidos, permitindo a expansão da árvore da vida, incluindo Bactérias, Archaeas e Eukarya. Desta forma, no ano de 2016, foi proposto a criação de uma nova árvore filogenética de procariotos, como pode ser vista na Figura 2.1. Para a montagem desta árvore, um conjunto de 16 sequências de proteínas ribossomais de cada organismo foi alinhado e concatenado, permitindo a geração de uma árvore filogenética de alta resolução. O uso de proteínas ribossomais evita o surgimento de artefatos que podem surgir quando se utiliza genes com funções independentes e sujeitos a diferentes processos evolutivos (Hug *et al.*, 2016). Outra importante vantagem do uso das proteínas ribossomais é que elas tendem a ser sintênicas e colocalizadas em uma pequena região genômica das bactérias e arqueias, reduzindo a margem de erro na geometria da árvore. A árvore atual conta com as sequências genômicas de 3.083 organismos ao todo. O principal foco desse estudo foram os Domínios Bacteria e Archaea,

visto a dificuldade de análises macroscópicas. A inserção do domínio Eukarya nessa árvore filogenetica é um pouco controversa. Acredita-se que os organismos eucariontes sejam considerados quimeras evolutivas que surgiram a partir da fusão endossimbiótica de 19 células bacterianas e archeanas (Hug *et al.*, 2016).

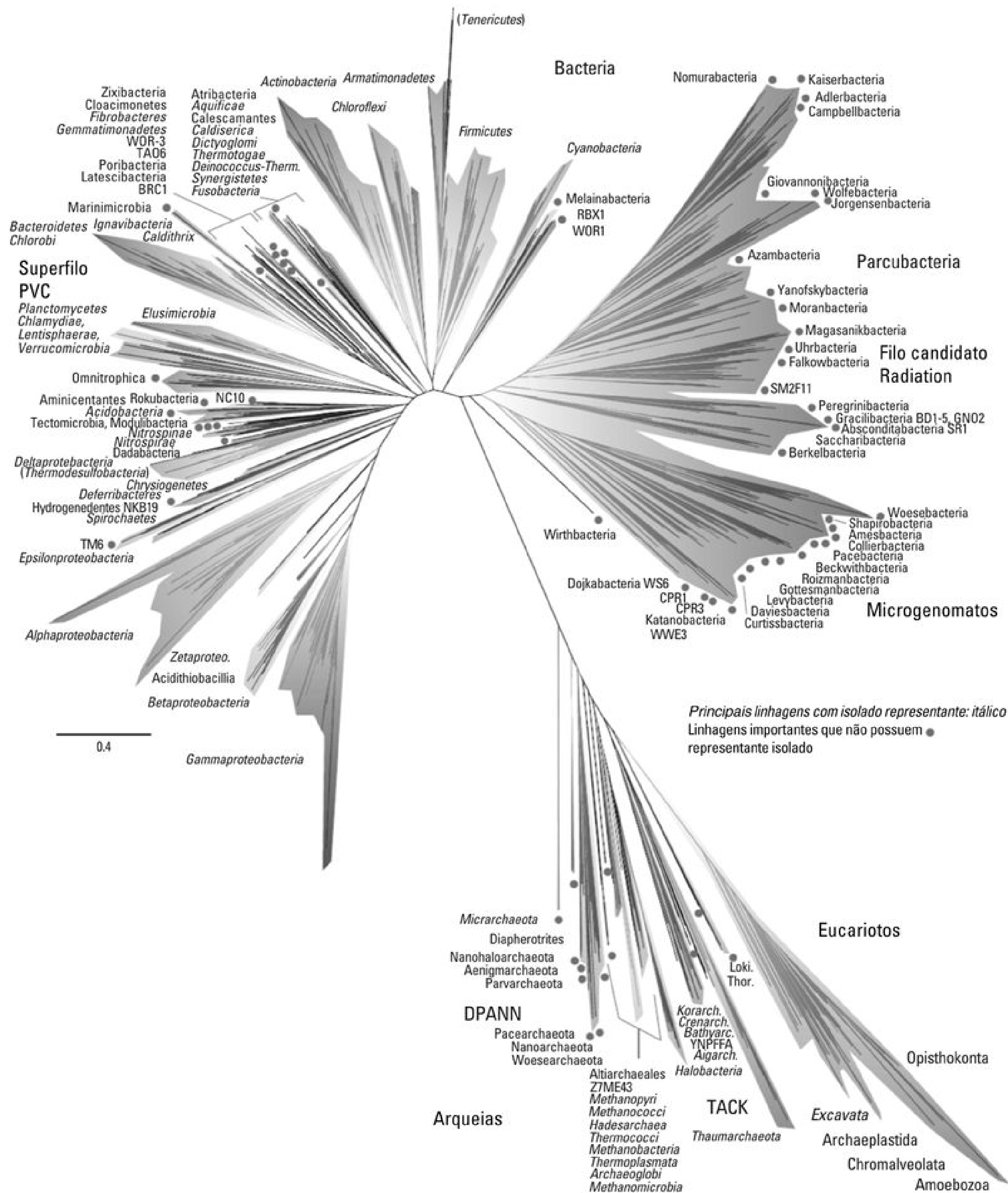


FIGURA 2.1 Nova proposta de árvore filogenética (2016) demonstrando que a maior diversidade biológica se encontra no Domínio Bacteria. Quase metade dos quais inclui "candidato Filo Radiation" que ainda estão à espera de serem descobertos. Os seres humanos estão no ramo inferior do eucariontes. *Fonte*: Hug *et al.* (2016).

A árvore da vida como a conhecemos se expandiu drasticamente, devido a novas amostragens genômicas de linhagens microbianas

previamente enigmáticas ou desconhecidas. A atual representação da árvore (Figura 2.1) demonstra a amostragem genômica mais recentemente descoberta, ilustrando o progresso em estudos de biologia molecular alcançado nos últimos 20 anos. Esta árvore mostra a profundidade da história evolutiva que está contida no interior das bactérias, em parte devido ao novo filo CPR (Candidate Phyla Radiation), que surge para subdividir ainda mais o domínio Bacteria. Mais importante, a análise evidencia a grande fracção de diversidade que atualmente é acessível apenas através de abordagens resolvidas no genoma-cultivo independente (Hug *et al.*, 2016).

Dentre os diferentes filos de procariotos existentes, os mais estudados e melhor caracterizados são, dentre outros, Proteobacteria, Actinobacteria, Firmicutes e Bacteroidetes. Por exemplo, bactérias do filo Proteobacteria representam o filo com mais espécies já descritas e, também, o grupo com maior diversidade fisiológica do domínio Bacteria. Esse filo é dividido em 5 classes: Alfaproteobacteria, Betaproteobacteria, Deltaproteobacteria, Epsilonproteobacteria e Gamaproteobacteria. Muitas bactérias do filo Proteobacteria são de grande importância biotecnológica. Nesse sentido, bactérias do gênero *Rhizobium*, da classe Alfaproteobacteria, possuem grande relevância para a agroindústria devido à capacidade de promover o crescimento de plantas através da fixação biológica do nitrogênio. A capacidade de fazer a fixação biológica do nitrogênio, uma característica que só é realizada por procariotos, também é encontrada em gêneros da classe Betaproteobacteria, como bactérias do gênero *Burkholderia*, e Gammaproteobacteria, como o gênero *Pseudomonas*, dentre outros. Além disso, bactérias do filo Proteobacteria, como as já citadas anteriormente, também possuem muita importância para aplicação na biorremediação de poluentes ambientais e também em diferentes processos biotecnológicos.

Como veremos com mais detalhes no final deste capítulo e, também, nos próximos, a diversidade taxonômica, metabólica e fisiológica encontrada nos procariotos é muitas vezes explorada para aplicações biotecnológicas. Bactérias do filo Firmicutes, como as bactérias formadoras de endósporos do gênero *Bacillus* e de gêneros correlatos, gênero *Clostridium*, e bactérias do filo Actinobacteria, como as pertencentes ao gênero *Streptomyces*, por exemplo, podem ser aplicadas em diferentes processos de importância biotecnológica, como na produção de enzimas de interesse industrial, na produção de compostos bioativos (substâncias antimicrobianas, solventes, ácidos orgânicos) e, mesmo, em processos de fixação biológica do nitrogênio e de degradação de poluentes orgânicos.

Entretanto, independente da grande diversidade de procariotos existente, a estrutura da unidade celular é fundamental para a vida desses microrganismos. Essa estrutura necessariamente deve ser resistente (para suportar as pressões ambientais), permeável e seletiva (permitindo a entrada e saída de diferentes moléculas e, ao mesmo tempo, bloqueando a entrada e saída de outras), e deve armazenar todas as estruturas essenciais para a vida procariótica. Vista de dentro para fora, a célula dos procariotos é, geralmente, separada em 3 compartimentos principais (que serão detalhados neste capítulo): espaço citoplasmático, membrana citoplasmática e parede celular. Em linhas gerais, o interior celular, chamado de espaço citoplasmático ou citoplasma, é um espaço rico em água onde são encontrados o nucleoide (código genético de cada célula) e todas as estruturas e moléculas necessárias para a função celular (ribossomos, proteínas, polissacarídeos e lipídeos). O citoplasma é delineado pela membrana citoplasmática. Essa última funciona como uma barreira seletiva que separa o interior celular do meio externo: é através da membrana citoplasmática que acontece a absorção (seletiva) de nutrientes para dentro do interior celular, e é por essa membrana que os resíduos gerados no metabolismo microbiano passam para fora da celular. A membrana citoplasmática é fina, flexível e frágil, qualquer dano nessa membrana pode representar a perda de material intracelular, o que leva à morte celular. É a parede celular, que está presente na maioria dos procariotos, a responsável por impedir o rompimento da membrana citoplasmática, contendo a pressão gerada pela alta concentração de solutos dissolvidos presentes no citoplasma. A parede celular é a estrutura mais externa da célula procariótica, e também a responsável pelo formato da célula e pela rigidez celular.

Todas as células procarióticas compartilham de um grupo de componentes necessários para o seu funcionamento, como proteínas, ribossomos, ácidos nucleicos, lipídeos e polissacarídeos. Além disso, compartilham funções comuns como: nutrição, crescimento e replicação.

2.3. Citologia celular

Os procariotos possuem tamanhos e formas diversos. Uma célula procariótica é primeiramente definida por seu formato celular (Figura 2.2). Por exemplo, células com morfologias esféricas ou ovoides são chamadas de cocos, enquanto células com formato morfológico cilíndrico são conhecidas como bacilos (ou bastonetes). Alguns bastonetes podem ser curvos e, estes, são conhecidos como espirilos. Uma segunda classificação dos procariotos com base na morfologia celular é dada em relação à organização de grupamentos celulares. Em alguns procariotos, as células se organizam em grupos após a divisão celular, e o formato desse agrupamento celular é específico para diferentes espécies. Procariotos com células esféricas (os cocos) podem se agrupar, por exemplo, aos pares (diplococos), em cadeia (estreptococos) ou em cachos (estafilococos). Os bastonetes também podem se apresentar isolados ou agrupados, podendo ser encontrados em dupla (diplobacilos), formando uma cadeia (estreptobacilos), entre outros.

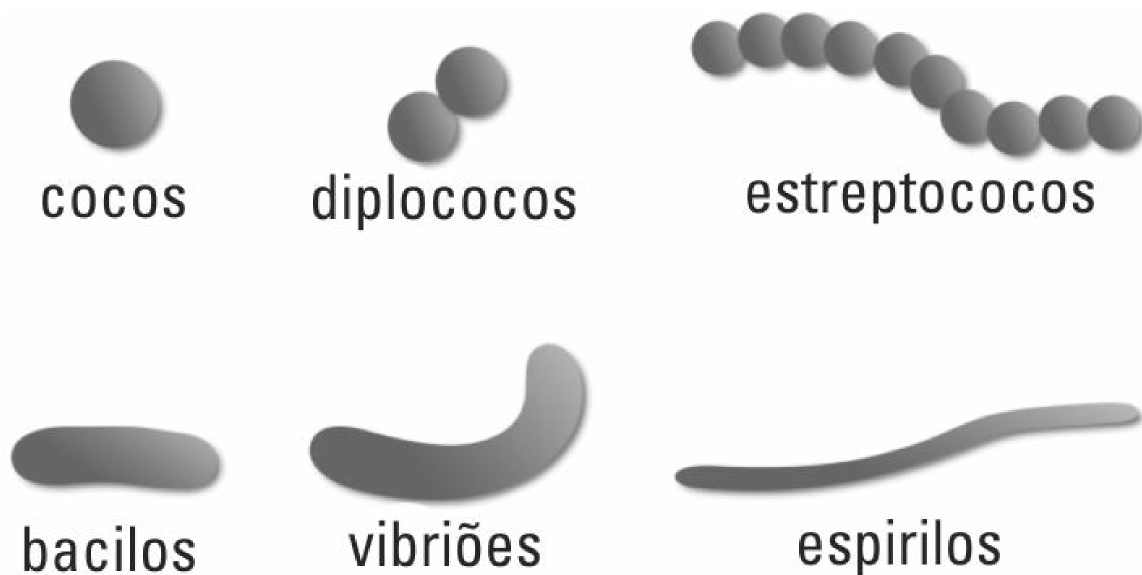


FIGURA 2.2 **Exemplos ilustrativos dos formatos celulares encontrados em organismos procarióticos.**

Quanto ao tamanho, o comprimento médio encontrado na maioria das células procarióticas é de 1,0 μm, sendo que as menores células já descritas

possuem menos de 0,05 µm de comprimento (nanobactérias) e as maiores células já encontradas possuem por volta de 0,8 mm (bactérias gigantes).

2.3.1. Estrutura celular

2.3.1.1. Membrana Citoplasmática

A membrana citoplasmática é uma fina camada (8 nm), flexível e frágil, que envolve toda a célula, delineando o espaço citoplasmático. Tanto nas células procarióticas como nos eucariotos, a membrana citoplasmática é um mosaico fluido onde a composição é de uma bicamada de, na maioria dos casos, lipídios complexos contendo duas cadeias de ácidos graxos, um grupamento fosfato e glicerol: os fosfolipídeos. Esse lipídio complexo, como todo lipídio, possui propriedade anfipática, ou seja, possui uma porção hidrofílica, o glicerol, e uma porção altamente hidrofóbica, os ácidos graxos. Na bicamada lipídica da membrana citoplasmática, os ácidos graxos se posicionam para o interior da bicamada, formando um ambiente hidrofóbico, enquanto as porções hidrofílicas continuam expostas ao ambiente aquoso do citoplasma celular e do exterior celular (Figura 2.3).

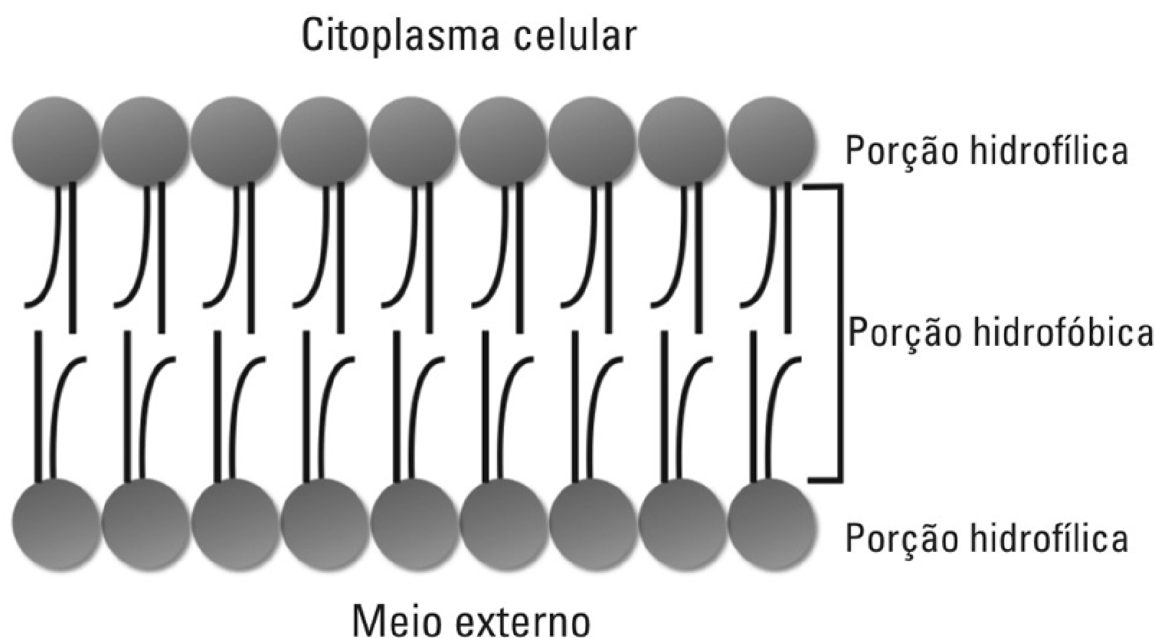


FIGURA 2.3 **Figura ilustrativa da estrutura da membrana citoplasmática e da organização dos fosfolipídios na membrana.**

A estrutura da membrana citoplasmática dos procariotos é relativamente similar. Entretanto, algumas diferenças podem ser encontradas, como, por exemplo, a presença de hopanoides na membrana citoplasmática de alguns procariotos. Esses compostos, que são análogos aos esterois encontrados na membrana citoplasmática de células eucarióticas, tornam, com sua presença, a membrana celular mais resistente. Outro exemplo de diferença é encontrado entre os lipídios presentes na membrana citoplasmática de arqueias e de bactérias. Primeiramente, nas arqueias as porções hidrofóbica e hidrofílica do lipídio são conectadas através de ligações do tipo éter ($—CH_2OR$), enquanto em bactérias, e mesmo na membrana citoplasmática de eucariotos, essa ligação é do tipo éster ($—CH_2—OCOR$). Além disso, as arqueias, na porção hidrofóbica do lipídio, ao invés de ácidos graxos, possuem unidades repetitivas de cadeias ramificadas de hidrocarbonetos, conhecidos como isoprenos.

Como estrutura que delimita o citoplasma celular e sendo a principal barreira seletiva para entrada e saída de moléculas da célula, a membrana citoplasmática é um lugar de interação com diferentes componentes celulares e agentes químicos. Muitas proteínas estão diretamente associadas com a membrana celular. Por exemplo, diferentes proteínas são encontradas embebidas na membrana citoplasmática. A maioria dessas proteínas possui superfícies hidrofóbicas nas regiões onde estão associadas com as cadeias de ácidos graxos. Essas proteínas, na maioria dos casos, extravasam a bicamada lipídica e, dessa maneira, possuem superfícies expostas tanto no interior como no exterior celular (são conhecidas como proteínas transmembranas). Em outros casos, proteínas hidrofílicas e outras substâncias iônicas, como cátions com Ca^{2+} e Mg^{2+}, se ligam às superfícies hidrofílicas da membrana citoplasmática. Por exemplo, em alguns procariotos, na superfície externa da membrana citoplasmática, que fica em contato com o ambiente, diferentes proteínas interagem com a membrana, atuando na ligação de diferentes substratos ou no transporte de diferentes moléculas para o interior celular. Por outro lado, na superfície interna da membrana citoplasmática, em contato direto com o citoplasma celular, diferentes proteínas envolvidas em reações de geração de energia para a célula, ou em outras funções celulares, também estão em contato com a membrana celular. Proteínas que interagem com a membrana citoplasmática possuem diferentes funções para célula procariotica, como veremos mais adiante. A membrana citoplasmática é um ambiente fluido e as proteínas e os fosfolipídios possuem liberdade de movimentação na superfície da membrana (Figura 2.4).

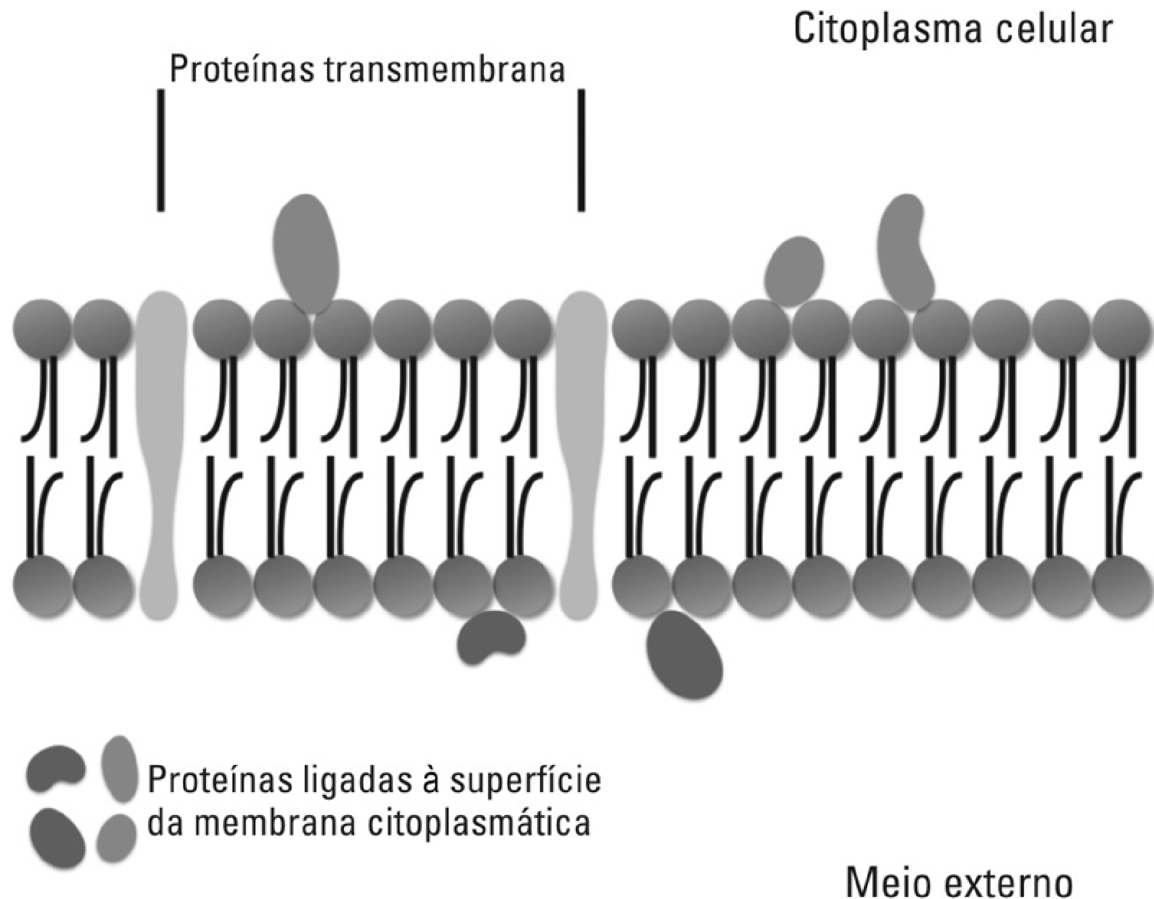


FIGURA 2.4 **Figura ilustrativa esquematizando a estrutura da membrana citoplasmática e a interação de diferentes proteínas na superfície da membrana.**

2.3.1.2. Parede Celular

A parede celular, que é a responsável pelo formato celular, está presente na maioria dos procariotos, exceto em bactérias do gênero *Mycoplasma* e em algumas espécies de arqueias. A função primária da parede celular é propiciar um rígido exoesqueleto para proteção contra a lise osmótica e mecânica, além disso, associadas à parede celular, podem ser encontradas diferentes moléculas com múltiplas funções, como sítios receptores de proteínas que interagem com a célula procariótica. Contudo, a parede celular de bactérias e arqueias é diferente em sua composição, como veremos nos tópicos mais adiante.

2.3.1.3. Parede Celular de Bactérias

As bactérias são divididas em dois grupos, com base na estrutura da parede celular: bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas. Em ambos os grupos a estrutura responsável pela rigidez e formato celular é formada por um polímero complexo conhecido como peptideoglicana. A composição exata da peptideoglicana pode ser diferente entre as espécies bacterianas, embora a estrutura básica seja sempre a mesma: cadeias formadas por unidades repetitivas de dissacarídeos, compostas por N-acetilglicosamina unida por ligação glicosídica do tipo β(1-4) ao N-acetil murâmico. A este último está ligada uma cadeia de ácidos aminados (cadeia de tetrapeptídeos), completando uma unidade repetitiva. A peptideoglicana presente na parede celular da maioria das bactérias é, portanto, formada por longas cadeias de unidades repetitivas, que são interconectadas através de ligações cruzadas entre os tetrapeptídeos de cadeias adjacentes (Figura 2.5).

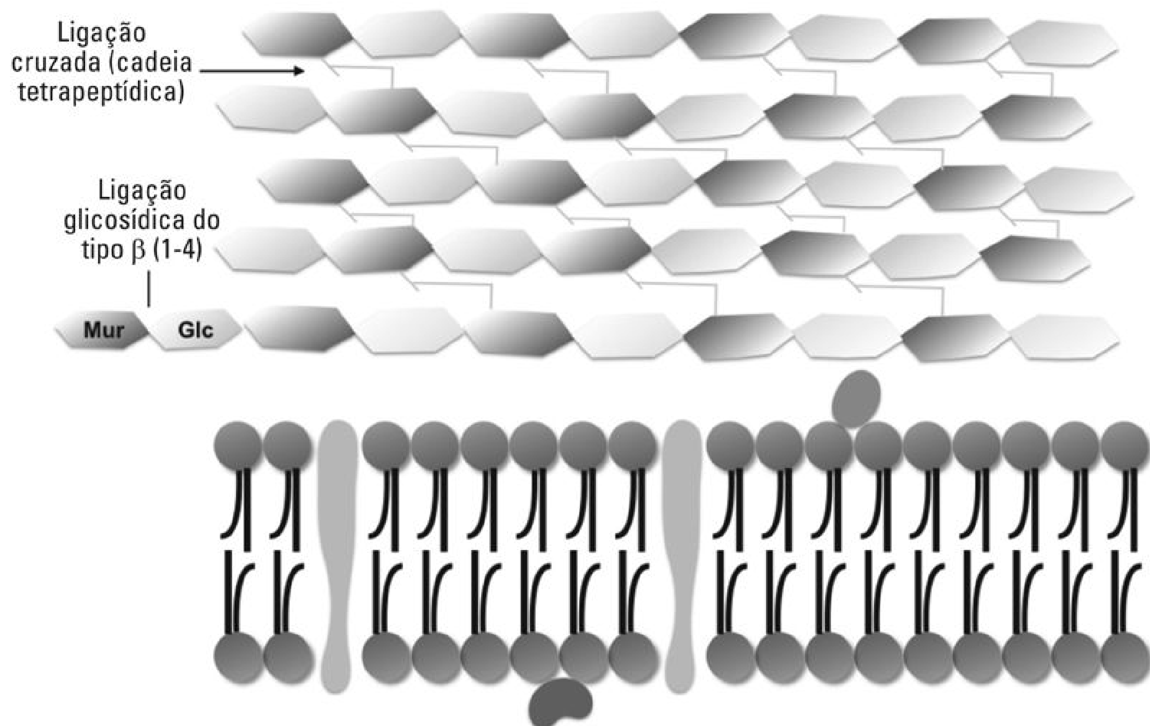


FIGURA 2.5 **Esquema ilustrativo da estrutura da peptideoglicana. A cadeia peptídica que faz a ligação cruzada entre as cadeias da peptideoglicana está ilustrada conectando o N-acetilmurâmico das cadeias adjacentes.**

As variações na estrutura de peptideoglicanas são encontradas na composição da cadeia de ácidos aminados (tetrapeptídeos) e, principalmente, no tipo de ligação cruzada entre os tetrapeptídeos. A composição dos grupamentos de ácidos aminados pode conter L-alanina (L-Ala), D-alanina (D-Ala), D-ácido glutâmico (D-Glu) e L-lisina (L-Lis) ou ácido diaminopimélico (DAP). É justamente na presença de DAP ou L-Lis que ocorrem as variações na cadeia dos ácidos aminados. Por exemplo, enquanto o DAP é encontrado em todas as bactérias Gram-negativas, na maioria dos cocos Gram-positivos ele é substituído por L-Lis. Por outro lado, quanto ao tipo de ligações cruzadas entre os tetrapeptideos, as diferenças podem ser várias. Em bactérias Gram-negativas a ligação cruzada ocorre, na maioria das vezes, diretamente através da ligação peptídica do grupamento amino (NH_2) do DAP ao grupamento carboxil (COOH) da D-Ala terminal. Em bactérias Gram-positivas, como, por exemplo, em bactérias da espécie *Staphylococcus aureus*, a ligação cruzada

entre os tetrapeptídeos ocorre entre o grupamento amino (NH_2) da L-Lis ao grupamento carboxil (COOH) da D-Ala terminal, através de um oligonucleotídeo composto por cinco unidades de glicina conectadas por ligações peptídicas. De fato, em bactérias Gram-positivas a ponte que une os tetrapeptídeos pode ser composta por outros ácidos aminados, como treonina, serina, ácido aspártico, entre outros.

2.3.1.4. Parede Celular de Bactérias Gram-Positivas

A parede celular de bactérias Gram-positivas é composta principalmente por peptideoglicana, o que, em alguns casos, pode representar 90% da parede celular dessas bactérias. Entretanto, outros tipos de moléculas também são encontrados nas paredes celulares de bactérias Gram-positivas, como o ácido teicoico, ácido lipoteicoico e diferentes proteínas. Os ácidos teicoicos são polímeros contendo resíduos de glicerol-fosfato ou ribitol-fosfato, que estão covalentemente ligados ao N-acetil murâmico da peptideoglicana. A esses poliois se encontram ancorados outros açúcares e, também, D-alanina. Adicionalmente, alguns ácidos teicoicos contendo glicerol são diretamente ligados a lipídeos presentes na membrana celular de bactérias Gram-positivas, e, por estarem diretamente associados com lipídios, esses são denominados de ácidos lipoteicoicos. Como os ácidos teicoicos e lipoteicoicos são carregados negativamente, eles são também responsáveis pela carga negativa da superfície celular de bactérias Gram-positivas (Figura 2.6).

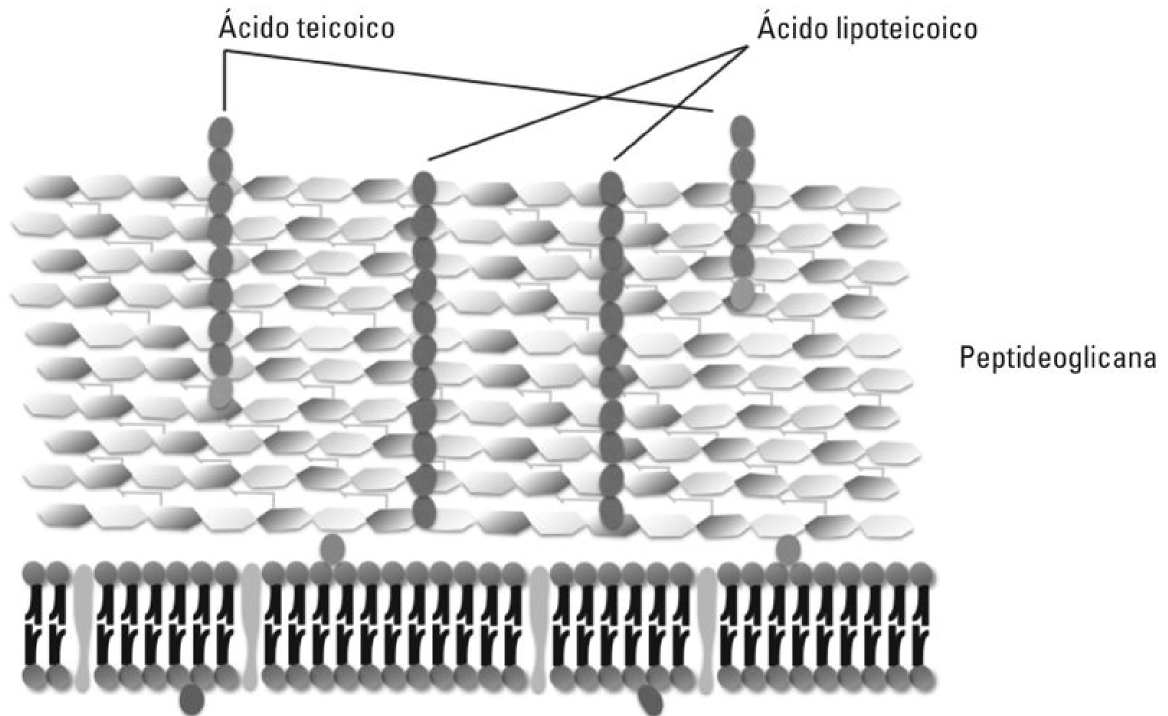


FIGURA 2.6 **Esquema ilustrativo da parece celular de bactérias Gram-positivas, mostrando a espessa camada de peptideoglicana e a presença de ácidos teicoicos e lipoteicoicos.**

2.3.1.5. Parede Celular de Bactérias Gram-Negativas

Diferente da parede celular de bactérias Gram-positivas, a peptideoglicana representa em torno de 10% da parede celular de bactérias Gram-negativas. Nessas últimas, a parede celular é formada ainda por uma camada lipopolissacarídica que é encontrada mais externa à peptídeoglicana, que também é conhecida como membrana externa, e por um espaço gelatinoso que fica entre a membrana citoplasmática e a membrana externa, chamado de espaço periplasmático (ou periplasma). O espaço periplasmático é um compartimento onde estão localizadas diferentes macromoléculas com diferentes funções. Geralmente três tipos de enzimas são encontrados no espaço periplasmático: enzimas hidrolíticas (iniciam a degradação de nutrientes), proteínas de ligação (envolvidas no transporte de moléculas para o interior celular) e quimioreceptores (Figura 2.7).

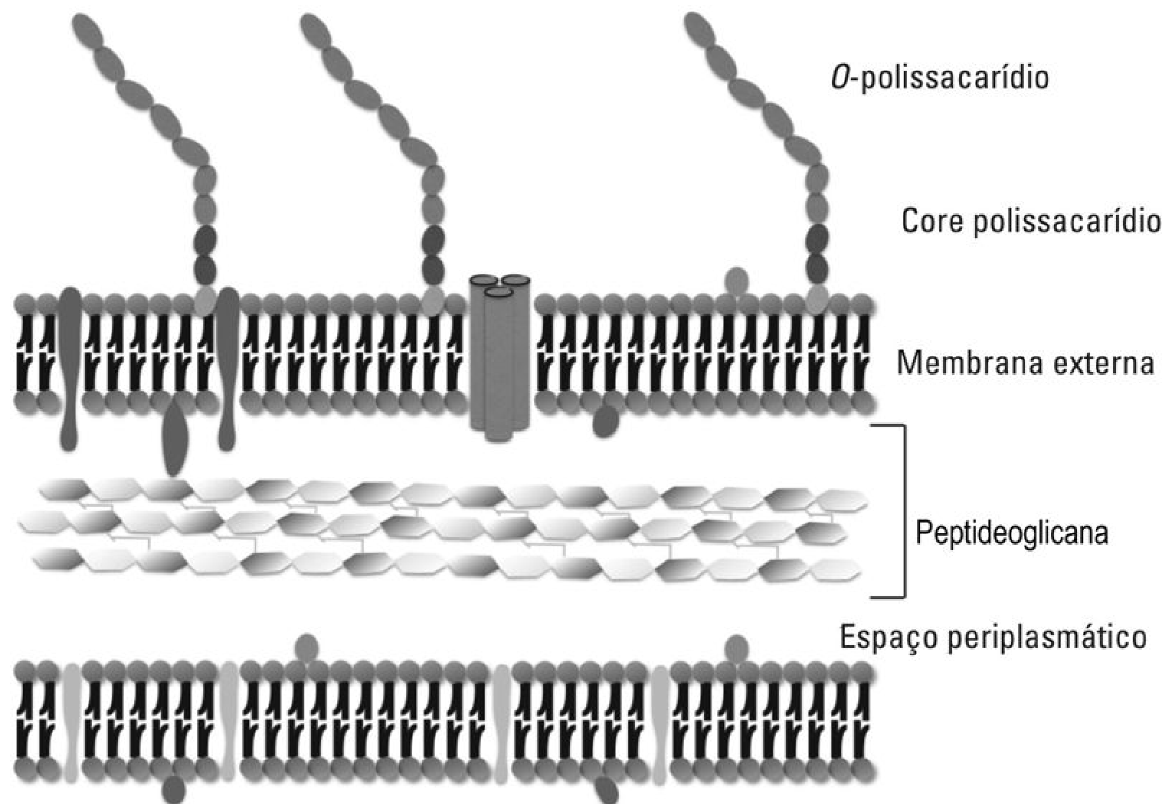


FIGURA 2.7 Modelo ilustrativo da parede celular de bactérias Gram-negativas, mostrando o espaço periplasmático, a fina camada de peptideoglicana, a membrana externa (com a porção polissacarídica em destaque) e a interação com diferentes proteínas.

A camada lipopolissacarídica (camada LPS) é uma estrutura que reveste as células das bactérias Gram-negativas. Assim como a membrana citoplasmática, a membrana externa é uma bicamada lipídica, entretanto sua constituição não é somente de fosfolipídios, como na membrana citoplasmática, mas também de polissacarídeos e proteínas. Nesse caso, os lipídios e polissacarídeos estão conectados formando estruturas lipopolissacarídicas específicas na membrana externa. Os polissacarídeos que compõem a camada LPS são divididos em duas porções, o core polissacarídico e a porção *O*-polissacarídio (antígeno O) (Figura 2.7). A estrutura do core polissacarídico é igual para todas as bactérias Gram-negativas, e é composto por: ácido 2-ceto-3-desoxioctulosônico (KDO), heptoses (açúcares de sete carbonos), glicose, galactose e *N*-acetilglucosamina. Por outro lado, a composição e o arranjo da porção *O*-polissacarídio é variável entre as diferentes espécies de bactérias Gram-negativas. Em geral o *O*-polissacarídio é uma sequência repetida de 3 a 5 carboidratos; essas sequências podem ser repetidas até 25 vezes formando

o *O*-polissacarídio. Os carboidratos mais comuns são açucares de seis carbonos (como galactose, glicose, ramnose e manose), e um ou mais açucares incomuns, como abequose, coletose, paratose ou tivelose.

A porção lipídica da camada LPS é conhecida como lipídio A. Esse lipídio não é um glicerol lipídio e os ácidos graxos do lipídio A são conectados por ligação éster e amida ao dissacarídio *N*-acetilglucosamina. Os ácidos graxos encontrados no Lipídio A incluem os ácidos graxos como caproico, láurico, mirístico, palmítico ou esteárico. O lipídio A é conhecido, também, como a parte tóxica da camada LPS, sendo considerado uma endotoxina.

Na membrana externa, a camada LPS está associada a várias proteínas (Figura 2.7). Muitas dessas proteínas são as responsáveis por ancorar a membrana externa à camada de peptideoglicana. Essas proteínas são do tipo lipoproteínas, onde os ácidos graxos ficam embebidos na região hidrofóbica da membrana externa e a parte proteica da lipoproteína está conectada à peptideoglicana através do grupo amino da lisina terminal ao ácido diaminopomélico (DAP). A ligação das lipoproteínas com a camada LPS e a peptideoglicana conferem estabilidade à membrana externa.

2.3.1.6. Parede Celular de Arqueias

A parece de celular de arqueias é distinta da parede celular de bactérias. Entretanto algumas arqueias compartilham de estruturas semelhantes à peptideoglicana bacteriana, que são conhecidas como pseudopeptideoglicana. Uma das principais diferenças entre a peptideoglicana bacteriana e a pseudopeptideoglicana de arqueias é que o açúcar N-acetilmurâmico e o aminoácido diaminopimélico (DAP) não são encontrados em arqueias. A pseudopeptideoglicana é formada, então, por unidades repetitivas de *N*-acetilglicosamina e *N*-acetiltalosaminurônico. Esses dois açúcares aminados são ligados através de ligação glicosídica do tipo β(1-3), em vez da ligação β(1-4) típica da peptideoglicana de bactérias. A ligação cruzada entre as cadeias polissacarídicas também ocorre através de cadeias de ácidos aminados, que nas pseudopeptideoglicanas estão conectados ao *N*-acetiltalosaminurônico. Entretanto, os aminoácidos são todos do tipo L-aminoácidos, ao invés dos D-aminoácidos encontrados nas peptideoglicanas de bactérias.

Nas arqueias outras estruturas com a função de manter a integridade celular também são encontradas. Por exemplo, algumas arqueias possuem uma parece celular composta apenas por uma espessa camada de polissacarídeos. Dentre esses polissacarídeos, os mais comuns são a

galactosamina, o ácido glucurônico e a glicose. Outras arqueias, como algumas arqueias halofílicas e outras hipotermofílicas, possuem uma parede celular composta somente por glicoproteínas. Além dessas, algumas arqueias não possuem carboidratos na parede celular. Nesses casos, somente proteínas são encontradas na parede celular desses procariotos.

2.4. Atividade, funções e estruturas celulares de células procarióticas

2.4.1. Funções celulares relacionadas com a estrutura da membrana citoplasmática: mecanismo de transporte de substância

Como dito anteriormente, a membrana citoplasmática funciona como uma barreira seletiva da entrada e saída de moléculas do interior celular. Sendo assim, o transporte de substâncias é basicamente dependente da passagem de diferentes moléculas pela membrana citoplasmática. Como a membrana citoplasmática possui permeabilidade seletiva, algumas substâncias podem passar diretamente através da membrana. Em outros casos, o transporte de substâncias através da membrana celular é mediado por diferentes proteínas. Sendo assim, os mecanismos de transporte de substâncias através da membrana citoplasmática podem ser divididos em dois grandes grupos: (i) independentes de energia e (ii) dependentes de energia (Figura 2.8).

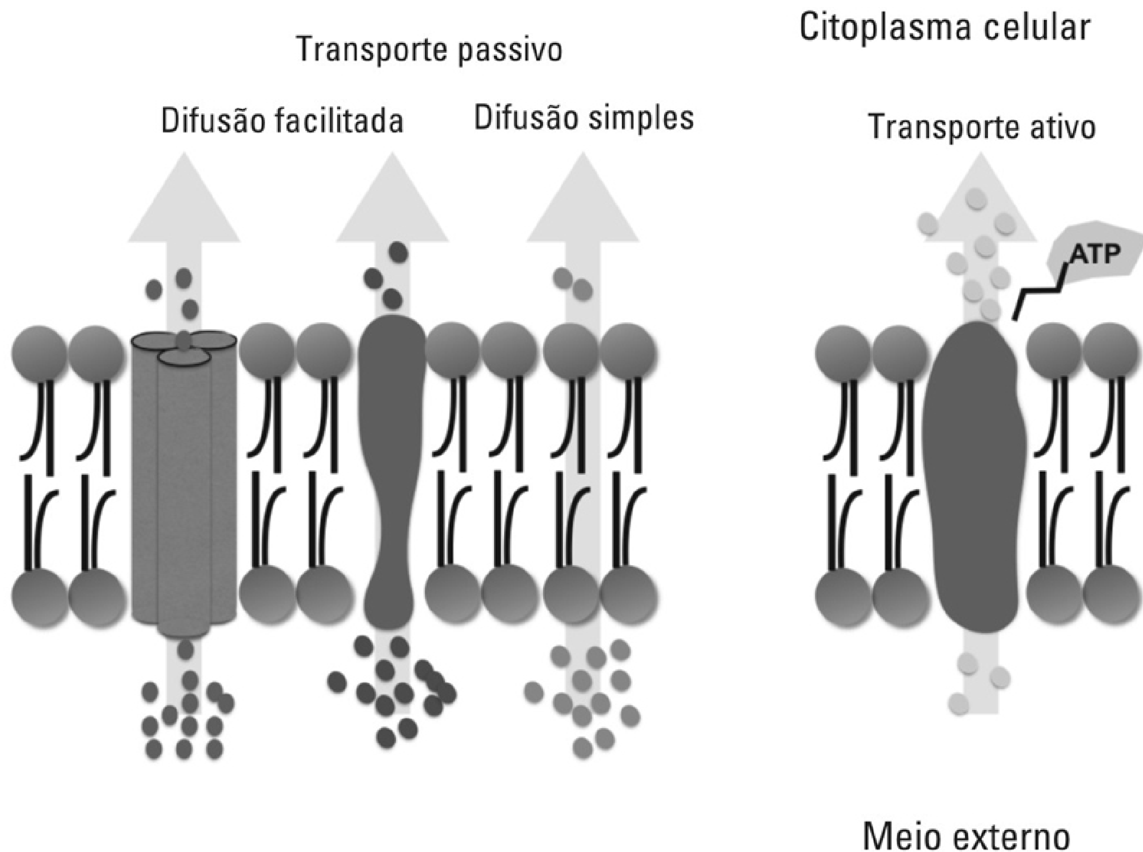


FIGURA 2.8 Modelo ilustrativo do transporte de substâncias pela membrana citoplasmática de procariotos. Em destaque, exemplos de transporte passivo, como processos de difusão facilitada e difusão simples, e exemplos de transporte ativo.

2.4.1.1. Tipos de transporte de substância que independem de gasto energético

Os mecanismos que independem de gasto energético são também conhecidos como transporte passivo. Por exemplo, a água, por ser uma molécula não carregada e suficientemente pequena, passa livremente entre as moléculas de fosfolipídeos da membrana citoplasmática, em um processo conhecido como osmose. O transporte da água através da membrana citoplasmática ocorre em reposta à concentração de gradiente do soluto (do interior ou do exterior celular), sempre da região com menores concentrações de soluto para a região com maiores concentrações de soluto. Adicionalmente, algumas substâncias não polares e solúveis em gorduras, como alguns ácidos graxos, álcoois e benzenos, também podem mover-se passivamente através da membrana citoplasmática respeitando

um gradiente de concentração (movem-se da região onde estão mais concentrados para a região onde estão menos concentrados). Esse mecanismo, que é dependente da permeabilidade da membrana a esses compostos, é conhecido como difusão passiva. Algumas proteínas também podem auxiliar no transporte passivo. Por exemplo, diferentes proteínas, que, nesse caso, são chamadas de proteínas facilitadoras, auxiliam na difusão de moléculas através da membrana citoplasmática em um processo que independe de gradientes de concentração e de energia (Figura 2.8).

2.4.1.2. Tipos de transporte de substância que dependem de gasto energético

Os mecanismos de transporte de substâncias que dependem de energia são mais complexos e incluem, entre outros, o transporte ativo, a translocação de grupo e a atividade de proteínas carreadoras ou ligadoras de substrato. No primeiro exemplo, o transporte ativo, proteínas transmembranas chamadas de permeases são as responsáveis por transportar moléculas através da membrana citoplasmática. Essas proteínas utilizam energia gerada através da força próton-motiva (como veremos mais à frente). As permeases podem ser classificadas de três maneiras diferentes, relacionadas com o tipo de transporte que realizam: (i) uniporte: carreiam somente uma substância; (ii) simporte, carreiam mais de um substrato simultaneamente, na mesma direção; e (iii) antiporte: carreiam substratos simultaneamente, mas em direções opostas.

Na translocação de grupo, o transporte ocorre concomitantemente à alteração química da substância transportada. Essa alteração no substrato transportado faz com que não ocorra a formação de uma concentração de gradientes através da membrana, já que o produto encontrado no citoplasma celular é quimicamente diferente do substrato encontrado no exterior celular. A translação de grupo é o mecanismo no qual diferentes açúcares, como glicose, manose, frutose, N-acetilglicosamina e ß-glicosídeos, são transportados para o interior celular. Esses açúcares são fosforilados durante o transporte para o interior celular, em um processo mediado por sistemas de proteínas chamadas de fosfotransferases.

Proteínas carreadoras ou ligadoras de substratos participam do transporte de diferentes solutos, como aminoácidos, íons, carboidratos, lipídeos e mesmo pequenas proteínas. Esse mecanismo de transporte, também conhecido como sistema ABC, é dependente de ATP e envolve um complexo de proteínas associadas à membrana citoplasmática, em

bactérias Gram-positivas, e também à membrana externa e ao espaço periplasmático em bactérias Gram-negativas. Em bactérias Gram-negativas, por exemplo, o transporte de maltose envolve uma porina localizada na membrana externa que é a responsável por transportar a maltose para o periplasma, onde uma proteína ligadora carreia esse composto até um sistema de proteínas localizado na membrana citoplasmática que realiza o transporte para o interior celular, utilizando energia liberada pela quebra de ATP. Em bactérias Gram-positivas, as proteínas ligadoras de substratos estão diretamente localizadas na membrana citoplasmática (Figura 2.8).

2.4.1.3. Mobilidade celular e quimiotaxia

Os procariotos possuem diferentes mecanismos de mobilidade. Algumas bactérias conseguem se movimentar em superfícies sólidas por deslizamento (através de estruturas como o pilli do tipo IV), enquanto alguns procariotos, que vivem em ambientes aquáticos, controlam a sua posição na coluna d'água através da presença de vesículas de gás. Entretanto, a maioria dos procariotos móveis possui estruturas não flexíveis, semirrígidas, helicoidais ancoradas na superfície de suas células, os flagelos. Essas estruturas podem ser encontradas em vários arranjos e localizações na célula. A flagelação celular pode ser polar, peritríquia ou lofotríquia. Em células com flagelação polar, um flagelo pode ser encontrado em uma ou ambas as extremidades da célula. A flagelação lofotríquia também ocorre em uma das extremidades da célula, mas essa flagelação é caracterizada pela presença de um grupo (tufo) de flagelos. Na flagelação peritríquia, os flagelos são ancorados em diferentes locais da superfície celular. A organização e localização dos flagelos na célula são utilizadas na classificação de espécies de procariotos (Figura 2.9).

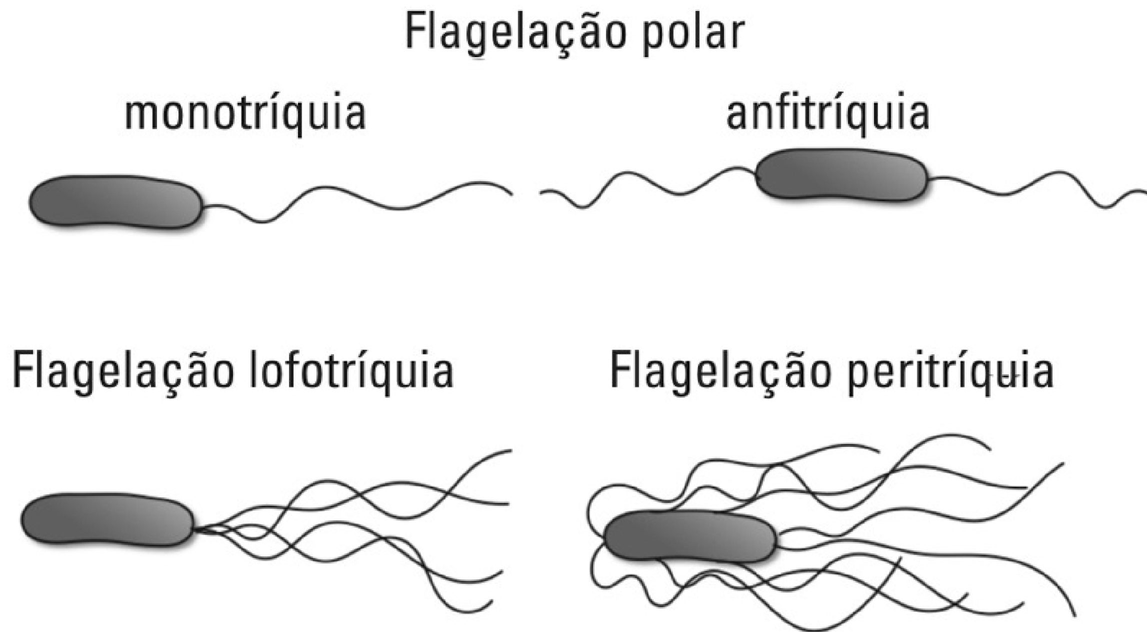


FIGURA 2.9 Modelos ilustrativos de uma célula procariaica e os diferentes tipos de flagelação encontrados nos procariotos.

A estrutura de um flagelo é dividida em três partes: o corpo basal, um filamento externo e uma junção flexível, que une o filamento ao corpo basal. O filamento do flagelo é composto apenas por subunidades da proteína flagelina. A estrutura do corpo basal é diferente do restante do flagelo; ela é parecida com um motor que, entre outras coisas, está envolvido na conexão do flagelo com o envelope celular. Essa estrutura é composta por um pequeno cilindro central que passa através de um sistema de anéis. Em bactérias Gram-negativas, o corpo basal possui quatro anéis: o par de anéis MS (membrana-supramembrana), que está conectado à membrana citoplasmática; o anel P, que está conectado à peptideoglicana; e o anel L, que está associado à membrana externa. Em bactérias Gram-positivas, somente os anéis MS são encontrados (Figura 2.10).

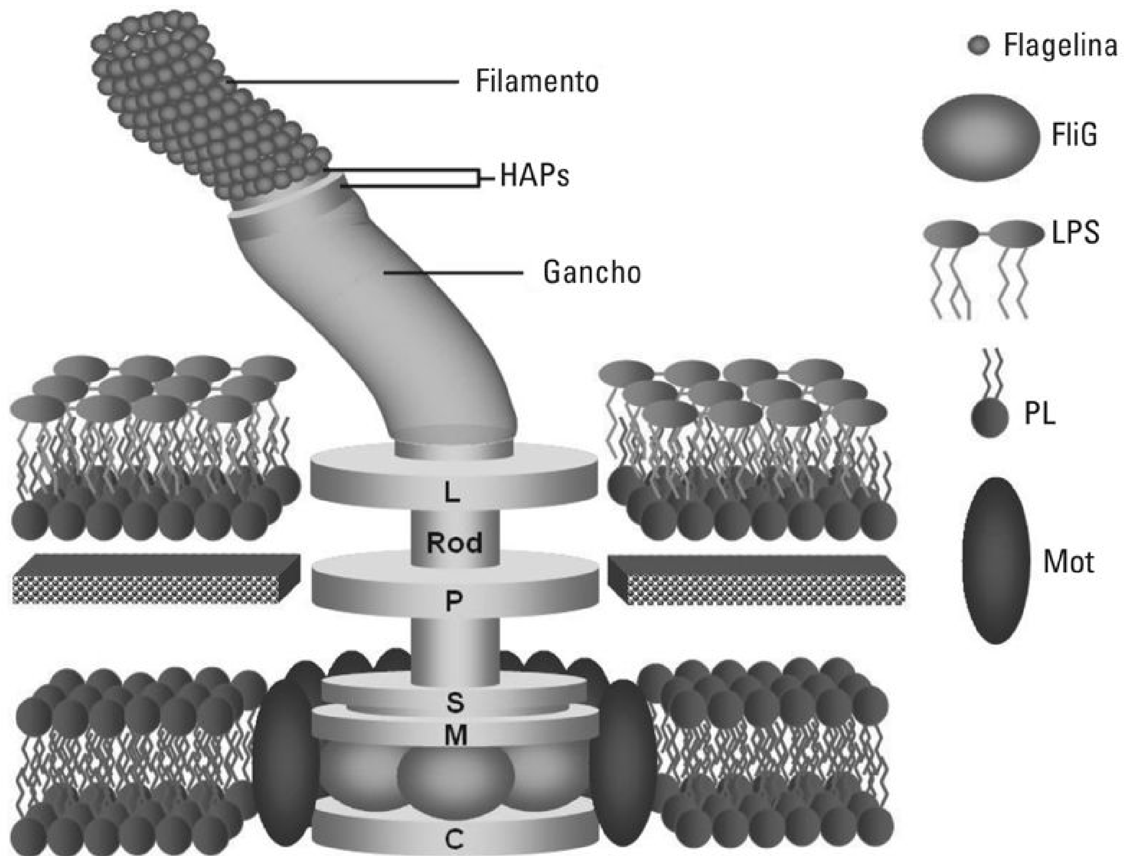


FIGURA 2.10 Esquema da estrutura do flagelo bacteriano, modelo bactéria Gram- negativa. C (anel C na membrana citoplasmática); M/S (anéis motor na membrana citoplasmática); P (anel P, no periplasma); L (anel L, na membrana externa); Mot (proteínas motoras); HAPs (proteínas associadas ao gancho); PL (fosfolipídeo); Mot (proteínas motoras – bomba de prótons); LPS (lipopolissacarídeo); FliG (proteína da base do flagelo). *Fonte*: http://cronodon.com/BioTech/Bacteria_motility.html

O movimento de rotação do flagelo é originado no corpo basal e requer energia. Essa energia é proveniente da formação de um gradiente de próton H^+ estabelecido na membrana citoplasmática, a força próton-motiva (como veremos mais adiante). A movimentação de células procarióticas, proveniente da rotação flagelar, ocorre muitas vezes em resposta a estímulos químicos, em processos conhecidos como quimiotaxia. A quimiotaxia pode ser positiva, quando o movimento celular ocorre em direção a um componente químico, ou, por outro lado, pode ser negativa, quando o movimento celular ocorre em direção oposta a um componente químico. Agentes químicos que induzem a quimiotaxia positiva são conhecidos como agentes atrativos e representam algum

benefício para a célula (podem ser nutrientes, por exemplo). O componente químico que induz a quimiotaxia negativa é chamado de agente repelente e, em geral, representa um dano para a célula.

Os procariotos contêm proteínas específicas para detectar a presença de agentes atrativos e repelentes. Essas proteínas, que são proteínas transmembranas, permitem à célula sentir se, ao longo do tempo, a concentração do agente químico aumenta ou diminui enquanto a célula se movimenta. A célula procariótica, então, responde à mudança na concentração do agente químico, ao invés do valor absoluto da concentração do agente químico no meio.

Existem outros tipos de taxias por onde uma célula procariótica pode se localizar e direcionar no meio ambiente, como a concentração de oxigênio, intensidade da luz e campos magnéticos. Por exemplo, algumas bactérias, que possuem inclusões celulares conhecidas como magnetossomos, respondem ao campo magnético natural da Terra, através de magnetotaxia. As bactérias fototróficas, por outro lado, utilizam a intensidade da luz para seu posicionamento no meio, através da fototaxia.

2.4.1.4. Outras estruturas de superfície celular e inclusões celulares

Os procariotos possuem diferentes estruturas de superfície que estão relacionadas com diferentes funções para as células. Algumas dessas estruturas serão citadas nesse tópico (para mais informações Brock *et al.*, 2010).

Fímbrias e pillus. As fímbrias e os pillus são estruturas similares aos flagelos, e ambos são formados por uma subunidade de proteínas. As fímbrias são mais numerosas que os flagelos (Figura 2.11). Essas estruturas não são encontradas em todos os procariotos e, nas bactérias que os possuem, estão relacionadas com a aderência das células a superfícies sólidas ou a formação de películas microbianas na superfície de líquidos.

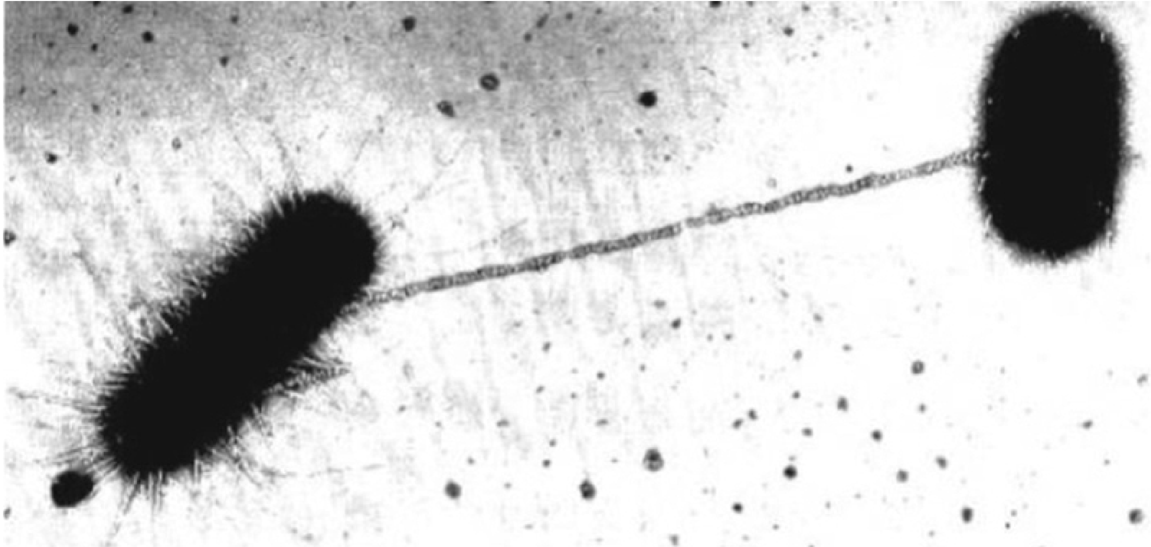


FIGURA 2.11 Micrografia eletrônica demonstrando a formação de um pillus sexual (A) e fímbrias (B). *Fonte*: http://leavingbio.net/bacteria/bacteria%20page-2.htm.

Os pillus possuem estruturas similares às fímbrias, embora geralmente maiores e presentes em menores quantidades na superfície celular (Figura 2.11). Existem diferentes tipos de pillus e eles estão envolvidos em diferentes atividades celulares, como na formação de pares de acasalamento para transferência lateral de genes e também para a aderência de espécies patogênicas a tecidos de hospedeiros. Praticamente todas as bactérias Gram-negativas possuem um ou mais tipos de pillus e estes também são encontrados em bactérias Gram-positivas.

Cápsulas e camadas limosas. Cápsulas e camadas limosas são substâncias poliméricas extracelulares (SPE) que são secretadas na superfície celular de muitos procariotos (Figura 2.12). A cápsula é uma camada rígida e espessa, enquanto a camada limosa é mais fina e frouxa. As estruturas das cápsulas e da camada limosa variam muito entre as diferentes espécies de procariotos, mas usualmente essas estruturas são compostas por glicoproteínas e uma grande variedade de polissacarídeos, incluindo polialcoois e açúcares aminados.

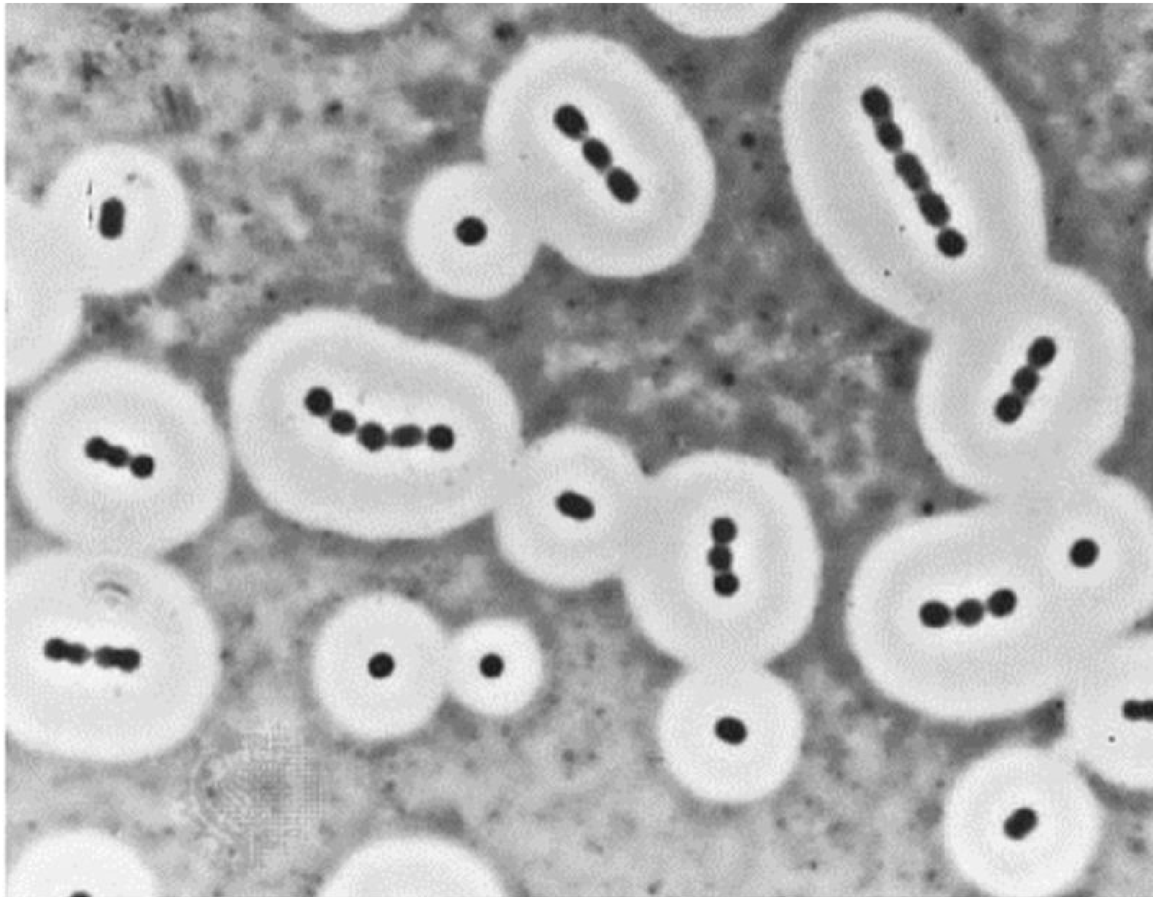


FIGURA 2.12 Micrografia óptica de bactéria contendo cápsula mucilagenosa. *Fonte*: http://global.britannica.com/science/bacteria/Capsules-and-slime-layers.

As funções das cápsulas e das estruturas limosas podem ser várias. Em microrganismos patogênicos, essas estruturas estão relacionadas com a adesão ao hospedeiro e, além disso, com a proteção contra células fagocíticas e contra o reconhecimento do sistema imune do hospedeiro, sendo um importante fator de virulência.

Inclusões celulares e material de reserva. Inclusões citoplasmáticas, como grânulos ou outras inclusões, são sempre encontradas em células procarióticas. Esses compartimentos servem para armazenar diferentes substâncias, como polissacarídeos, lipídeos, enxofre, entre outros, que podem ser utilizados, por exemplo, para geração de energia. A maioria dessas inclusões é formada por membranas lipídicas que separam as inclusões do citoplasma propriamente dito. Entretanto, a natureza das inclusões citoplasmáticas e o tipo composto armazenado variam entre diferentes grupos de procariotos.

As inclusões mais comuns de serem encontradas entre os procariotos incluem o armazenamento de poli 3-hidroxibutirato, glicogênio, polifosfatos, enxofre elementar, nitrato, ferro e entre outras. Algumas bactérias que acumulam ferro, como as bactérias magnéticas, possuem inclusões celulares chamadas de magnetossomos (Figura 2.13). Essas bactérias, que habitam ambientes aquáticos, possuem a capacidade de se direcionar pelo campo magnético da Terra.



FIGURA 2.13 **Fotomicrografia de um procarioto contendo inclusão magnética ao longo da sua estrutura celular.** *Fonte*: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Small_magnetosome.jpg?uselang=pt-br.

Endósporos. Endósporos são estruturas resistentes ao calor, desidratação, valores extremos de pH, diferentes agentes químicos, entre outros, que são produzidas por diferentes bactérias Gram-positivas

(Figura 2.14). A produção dessas estruturas especiais ocorre apenas quando o crescimento celular é interrompido devido a alterações nas condições ambientais, como, por exemplo, limitação de nutrientes. Nessas condições algumas bactérias são transformadas em estruturas dormentes e resistentes a diferentes fatores físicos e químicos, os endósporos. A presença dessas estruturas permite, então, que uma bactéria permaneça em estado de dormência no ambiente por muitos anos, podendo voltar ao seu estado vegetativo assim que as condições ambientais se tornem propícias para o seu desenvolvimento. Por essas características, as bactérias formadoras de endósporos são comumente encontradas em diferentes ambientes.

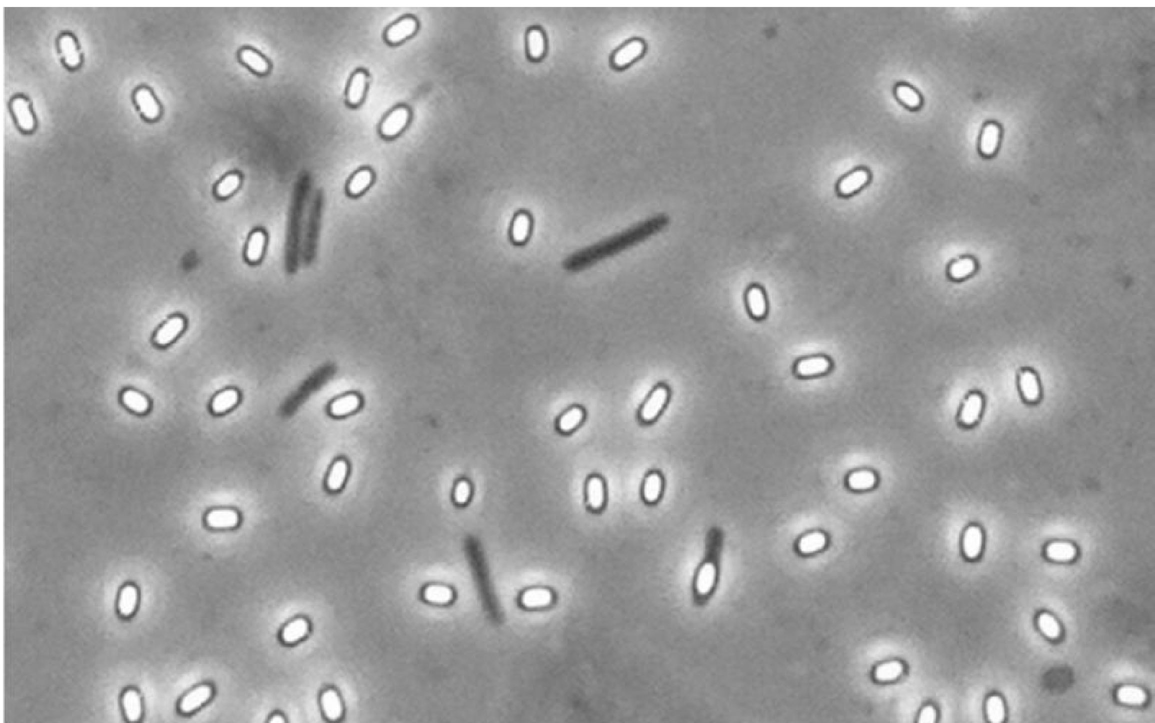


FIGURA 2.14 Microscopia óptica de bactérias do gênero *Bacillus*, indicando a produção de endósporos. *Fonte*: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Endospore_Bazillus.jpg?uselang=pt-br.

A estrutura do esporo é muito mais complexa do que a de uma célula vegetativa, do ponto de vista que a estrutura do esporo é formada por diferentes camadas. Essas camadas são divididas em 4 compartimentos: o exospório, a capa, o córtex e o core do esporo. A camada mais externa do esporo é conhecida como exospório, e envolve todo o endósporo. A capa é composta por camadas de proteínas, embora em algumas bactérias

formadoras de esporos a capa seja constituída por apenas uma camada. As proteínas que compõem a capa do endósporo também podem variar, sendo que em algumas espécies a capa é formada por apenas um tipo de proteína e em outras por vários tipos diferentes de proteínas. Abaixo da capa, o córtex é formado por camadas de peptideoglicana. Comparado com a peptideoglicana da célula vegetativa, a camada de peptideoglicana do córtex do endósporo possui muito menos ligações cruzadas. O córtex circunda o core do endósporo, e esse último compreende todas as estruturas da célula vegetativa, como a parede celular (parede do core), membrana citoplasmática, nucleoide, ribossomos, entre outros componentes celulares (Figura 2.15). Um dos fatores que fazem a estrutura do endósporo resistente ao calor e a outros fatores físicos e químicos é a presença de ácido dipicolínico (DPA), que não é encontrado em células vegetativas, em combinação com íons de cálcio, no core do endósporo. Esse complexo DPA-íons de cálcio representa até 10% do peso seco de um endósporo.

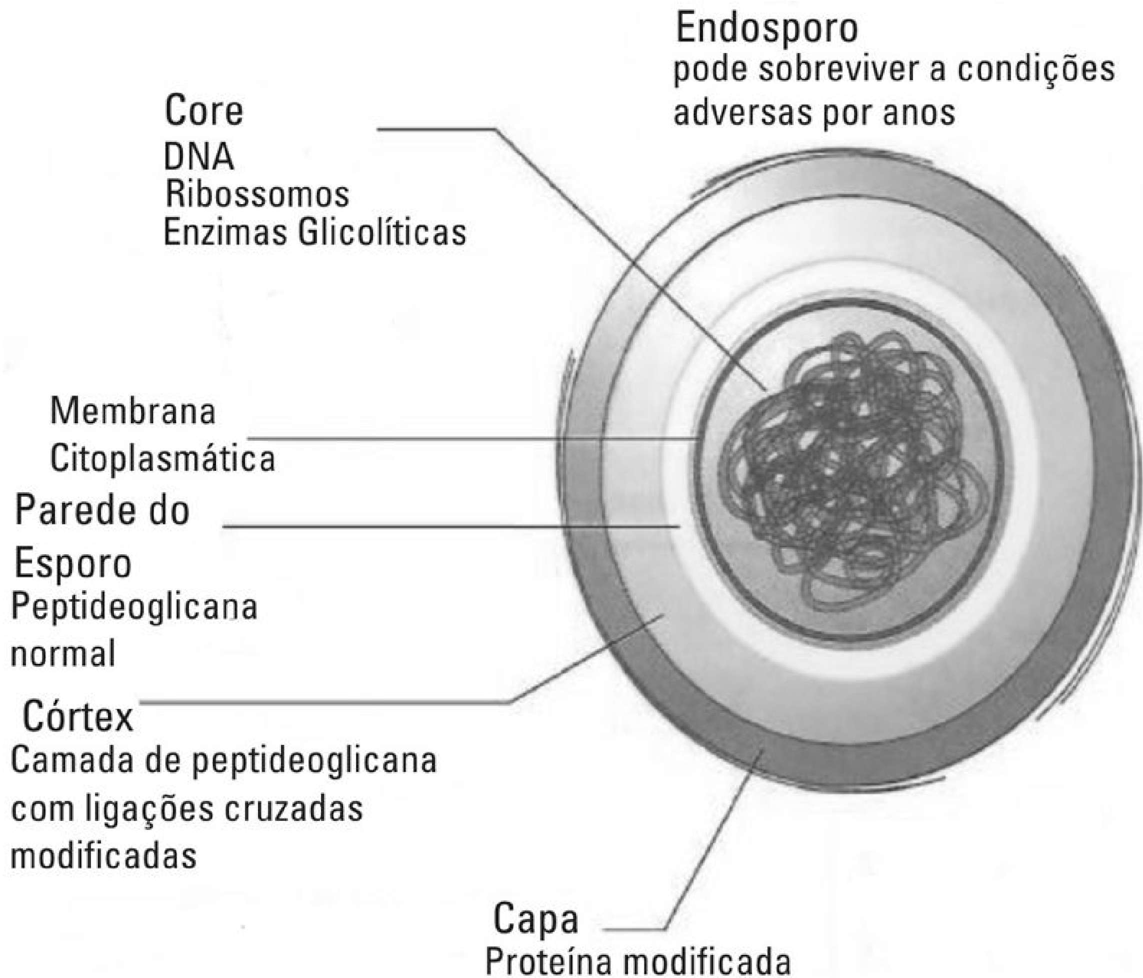


FIGURA 2.15 Esquema ilustrativo demonstrando a estruturação do endósporo. *Fonte*: http://microbeonline.com/bacterial-spores-structure-importance-and-examples-of-spore-forming-bacteria.

Como dito anteriormente, os endósporos podem ficar muito tempo em estado de dormência. Porém, em condições ideais, eles podem voltar a ser ativados e convertidos novamente em células vegetativas. Os fatores que ativam os endósporos podem ser vários, como presença de nutrientes, calor ou diferentes tratamentos químicos. O processo de transformação de um endósporo de volta a uma célula vegetativa envolve três etapas: ativação, germinação e crescimento. Como dito, a ativação ocorre em condições favoráveis para o crescimento celular. Por outro lado, a germinação é, em geral, um processo rápido que envolve a perda de retratilidade do endósporo, acompanhado da perda do complexo DPA-íons de cálcio. Nesse estágio a célula perde a resistência ao calor e a agentes químicos. A última etapa, o crescimento, inclui a entrada de água na célula e a síntese de RNA, ATP, DNA, entre outras macromoléculas.

Sendo assim, a célula emerge do rompimento da capa do endósporo e, na presença de todos os fatores necessários para seu desenvolvimento, volta a se dividir.

2.5. Fisiologia das células procarióticas

Assim como em todos os organismos vivos, o crescimento das células procarióticas é dividido em processos de catabolismo e anabolismo. Anabolismo é o processo, dependente de energia, no qual os nutrientes obtidos do meio ambiente são transformados em estruturas celulares. A energia utilizada durante o anabolismo é proveniente do catabolismo celular. Sendo assim, reações catabólicas resultam na liberação de energia, enquanto reações anabólicas resultam no consumo de energia. As células procarióticas podem utilizar duas fontes de energia: a luz e a energia química. Entretanto, a maioria dos procariotos obtém energia através da oxidação de compostos químicos.

Os microrganismos procariotos são classificados de acordo com seu metabolismo. Primeiramente, de acordo com o tipo de energia utilizada, os microrganismos podem ser divididos em:

- fototróficos (utilizam energia radiante, luz, como fonte de energia); e
- quimiotróficos (usam energia química obtida de compostos químicos).
- Os procariotos quimiotróficos podem ser divididos em outros dois grupos, dependendo do tipo de composto químico utilizado para geração de energia:
- quimiolitotróficos: utilizam compostos inorgânicos como doadores de elétrons; e
- quimiorganotróficos: utilizam compostos orgânicos como doadores de elétrons.

Além dessas classificações, os procariotos podem ser classificados, ainda, de acordo com a fonte de carbono utilizada na biossíntese celular:

- autotróficos: utilizam o carbono inorgânico, CO_2, como fonte de carbono; e
- heterotróficos: utilizam carbono orgânico como fonte de carbono.

Várias outras classificações são dadas aos procariotos com base no metabolismo celular, por exemplo, tipo de aceptores finais de elétrons, entre outros.

2.5.1. Mecanismos de obtenção de energia

Como mencionado anteriormente, os procariotos podem ser fototróficos ou quimiotróficos. Entretanto, em ambos os mecanismos a energia produzida é armazenada em moléculas de adenosina trifosfato (ATP), que é a molécula mais importante para capturar e transferir energia livre em

todos os sistemas biológicos. Sendo assim, nesse tópico serão abordados os mecanismos celulares que podem levar à produção de ATP, a partir de ADP (adenosina difosfato) e Pi, através de uma reação endergônica (requer energia).

A energia requerida para formação de ATP é proveniente da oxidação de compostos químicos, em organismos quimiotróficos, ou da conversão da energia da luz em energia química, nos procariotos fototróficos. Entretanto, em ambos os casos a formação de ATP ocorre, principalmente, através da quimiosmose. Em ambos os casos, a transformação da energia em ATP envolve a formação de um gradiente de concentração de prótons transmembrana, gerando um potencial elétrico, que é chamado de força próton-motiva. O processo de formação da força próton-motiva envolve o caminho percorrido pelos elétrons através de uma cadeia transportadora de elétrons, que nos procariotos está localizada na membrana citoplasmática.

O caminho dos elétrons através da cadeia transportadora de elétrons, que ocorre de uma substância com estado de energia mais alto para uma substância com estado de energia mais baixo, envolve sucessivas reações de óxido-redução (ou reações redox). Entende-se por oxidação a remoção de elétrons de uma substância, enquanto a redução é a adição de elétrons em uma substância. As substâncias variam na tendência de doar elétrons (serem oxidadas) ou aceitar elétrons (serem reduzidas). Essa tendência é expressa no potencial de redução (E_0) de cada substância. Entretanto, a maioria das substâncias pode servir tanto como doadora de elétrons, como aceptora de elétrons, dependendo das circunstâncias e de quais substâncias estão envolvidas na reação (para mais detalhes sobre mecanismos de transferência de elétrons Brock *et al.*, 2010).

Sendo assim, para que ocorra a formação da força próton-motiva, é necessário a presença de um doador de elétrons inicial (maior energia) e a presença de um aceptor de elétrons final (menor energia), sendo que na cadeia transportadora de elétrons as reações de oxidação-redução ocorrem sequencialmente. A quantidade de energia gerada nesse processo é dependente da diferença do potencial redox entre o doador de elétrons e o aceptor final de elétrons, sendo que quanto maior a diferença, mais energia será liberada na reação.

Várias proteínas associadas à membrana citoplasmática da célula procariótica atuam como intermediários da transferência de elétrons entre o doador de elétrons inicial e o aceptor de elétrons final. A composição da cadeia transportadora de elétrons na membrana citoplasmática de procariotos não segue o mesmo padrão em todas as espécies desses

microrganismos e, além disso, o padrão pode variar de acordo com as condições de crescimento delas. O único fator que é estável é a organização, no que diz respeito à organização dos transportadores de elétrons, pois esses seguem sempre a ordem do seu potencial de redução de maior energia para um de menor energia. Os principais componentes das cadeias transportadoras de elétrons de células procarióticas incluem flavoproteínas (proteínas contendo um derivado de riboflavina), quinonas (Coenzima Q, que é o único carreador que não é uma proteína), proteína ferro-enxofre (ferrodoxina, por exemplo) e citocromos (proteínas com grupo prostético heme), entre outros. O fato é que, à medida que os elétrons vão sendo transferidos ao longo da cadeia transportadora de elétrons localizada na membrana citoplasmática, os íons H^+ liberados no citoplasma são transferidos para o exterior celular, formando um gradiente eletroquímico de prótons na membrana citoplasmática. Resumidamente, esse gradiente de prótons é a força utilizada pela enzima ATPase (uma enzima transmembrana) para catalisar a reação de fosforilação do ADP a ATP, acoplando o retorno dos prótons (H^+) ao citoplasma celular.

Como já mencionado anterirmente, os procariotos podem utilizar diferentes compostos como doadores de elétrons e como aceptores finais de elétrons. Por exemplo, microrganismos quimiorganotróficos podem utilizar diferentes compostos orgânicos como fonte de energia. Por outro lado, procariotos litotróficos utilizam compostos reduzidos do enxofre (H_2S, S_0), do nitrogênio (NH_4^-; NO_3^-), entre outros, como doadores de elétrons. Quanto aos aceptores finais de elétrons, procariotos aeróbios utilizam o O_2 como aceptor final de elétrons, enquanto bactérias anaeróbias utilizam compostos oxidados do enxofre (SO_4^{2-}), nitrogênio (NO_3^-, NO_2^-), ferro, entre outros, como aceptor final de elétrons.

As etapas que antecedem a formação da força próton-motiva são variadas e dependem do tipo do doador de elétrons. Em procariotos quimiorganotróficos, por exemplo, que utilizam glicose como fonte de energia, dois caminhos metabólicos precedem a formação da força próton-motiva: a glicólise (principalmente através da via de Embden-Meyerhof), que oxida a glicose levando à formação de duas moléculas de ácido pirúvido, e o cliclo de Krebs, onde ocorre a descarboxilação total da molécula orgânica (ácido pirúvico gerado a partir da glicólise), resultando na formação de seis moléculas de CO_2. Tanto na glicólise, quanto no ciclo de Krebs a energia gerada pela oxidação da glicose vai ser utilizada para

gerar potenciais redutores que irão transferir elétrons para a cadeia transportadora de elétrons presente na membrana citoplasmática.

Esses potenciais redutores são gerados a partir da redução de diferentes coenzimas, que atuam como carreadores celulares de elétrons. Existem diferentes tipos de coenzimas com essa função, como nicotinamida adenina dinucleotídeo (sendo NAD+ o seu estado oxidado e NADH o seu estado reduzido), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADP + /NADPH) e flavina adenina dinucleotídeo (FAD + /FADH). Essas coenzimas possuem a capacidade de transportar prótons e elétrons. Na via de degradação da glicose, então, a força próton-motiva é originada a partir de elétrons liberados durante as vias glicolíticas e o ciclo de Krebs, sendo que os elétrons transferidos na cadeia transportadora de elétrons são fornecidos pelas formas reduzidas das coenzimas NAD+ (o NADH) e FAD (o FADH).

2.5.1.1. Mecanismos de obtenção de energia: fosforilação ao nível do substrato

Em algumas condições de crescimento, geralmente em ambientes limitantes de aceptores finais de elétrons, alguns microrganismos produzem ATP em um processo de óxido-redução de compostos orgânicos internamente balanceados, conhecido como fermentação. Nesses processos, o ATP é sintetizado a partir da oxidação parcial dos átomos de carbono de um composto orgânico, e, dessa maneira, o potencial de liberação de energia é bem reduzido quando comparado com a oxidação completa da matéria orgânica (como visto anteriormente).

Existem diferentes tipos de fermentação e eles serão abordados em outros capítulos. Mas, em todos os casos, a oxidação em processos fermentativos é sempre acoplada à subsequente redução do composto orgânico gerado pelo catabolismo do substrato inicial, o que gera um produto da fermentação. Por esse motivo, a produção de ATP através da fermentação é um processo conhecido como fosforilação ao nível de substrato.

Um exemplo de processos fermentativos envolve, por exemplo, a via glicolítica de Embden-Meyerhof (como descrito anteriormente). Nesse caso, na fermentação, o ácido pirúvico produzido a partir da glicose (que é o composto orgânico gerado pelo catabolismo do substrato inicial) é reduzido, balanceando a reação de óxido-redução (ou seja, os elétrons gerados pela oxidação parcial da glicose são novamente utilizados para reduzir o ácido pirúvico). A redução do ácido pirúvico pode levar à

formação de uma variedade de produtos da fermentação, como etanol, ácido lático, entre outros. Em todos os casos, no processo de fermentação da glicose duas moléculas de ATP são consumidas em etapas da via glicolítica e outras quatro são sintetizadas. O balanço final da fermentação da glicose é, então, de duas moléculas de ATP por cada molécula de glicose fermentada.

2.5.2. Nutrientes e condições de crescimento

Os procariotos necessitam de nutrientes específicos para seu desenvolvimento. Os nutrientes podem ser de vários tipos, e são classificados em três categorias principais: macronutrientes, micronutrientes e fatores de crescimento.

Macronutrientes são os elementos principais da constituição da célula procariótica, como o carbono, nitrogênio, enxofre e fósforo. Além desses, elementos como potássio, magnésio, cálcio, sódio e ferro também são essenciais para a atividade das células microbianas.

Já os micronutrientes são compostos requeridos em quantidades pequenas. Geralmente esses compostos são íons metálicos que são encontrados naturalmente na água, no solo, entre outros ambientes. Dentre esses micronutrientes podemos citar compostos como o manganês, cobalto, zinco, cobre, entre outros. Todos esses compostos são importantes para diferentes funções celulares.

Além dos nutrientes necessários para a construção e função da célula, os procariotos requerem condições ambientais específicas para o seu desenvolvimento. Como a diversidade de procariotos é enorme, não existe uma condição ambiental única, para o cultivo de todas as espécies de bactérias e arqueias. Por exemplo, diferentes espécies de procariotos requerem concentrações diferentes de O_2. Alguns são aeróbios obrigatórios e precisam do oxigênio para a respiração celular, entretanto, outros são anaeróbios e não toleram a presença de O_2 no meio de crescimento. Há ainda aqueles conhecidos como microaerófilos, que só crescem em ambientes com baixas concentrações de O_2. Essas diferenças de crescimento de diferentes espécies são encontradas também em outros fatores ambientais, como pH, temperatura, salinidade, entre outras.

2.6. Genética dos procariotos

Como todo ser vivo, os procariotos seguem o dogma central da biologia: possuem uma informação genética composta de DNA (ácido desoxirribonucleotídeo) que é duplicada e transmitida aos descendentes através da divisão celular. Além disso, essa informação genética, numa célula metabolicamente ativa, é transcrita em moléculas de RNA (ácido ribonucleico) onde a informação contida pode ser traduzida para produção de polipeptídeos com função estrutural ou enzimática, através dos ribossomos (mais informações sobre processos de duplicação de DNA, transcrição e tradução podem ser encontradas em Brock *et al*., 2010).

Sendo assim, o material genético dos procariotos é, como em todos os outros organismos vivos, composto por DNA (ácido desoxirribonucleico). Esse DNA, que representa o código genético que é repassado aos descendentes durante a divisão celular, é uma molécula de fita dupla formada por cadeias de polinucleotídeos antiparalelas e complementares. Em células eucarióticas, o DNA se encontra dentro de um compartimento especializado chamado de núcleo. Por outro lado, o material genético dos procariotos se encontra disperso no citoplasma da célula, de uma maneira condensada e organizada, no que é conhecido como nucleoide. Outras diferenças entre o código genético de eucariotos e procariotos serão pontuadas ao longo desse tópico.

O DNA cromossômico é o principal componente do genoma dos procariotos. Nos procariotos, diferentemente dos eucariotos, o cromossomo é formado, geralmente, por uma única molécula de DNA fita dupla, covalentemente fechada e circular. O tamanho do cromossomo dos procariotos varia entre 500 e aproximadamente 10.000 kb (kb; 1 kb = 1.000 pares de base, pb), sendo, em média, 1.000 vezes menor do que o DNA dos eucariotos. O tamanho estendido do DNA cromossômico é, muitas vezes, bem maior do que a célula que o possui (na bactéria *Escherichia coli*, por exemplo, o DNA é pelo menos 1.000 vezes maior do que a célula dessa bactéria). Sendo assim, o DNA precisa ser enrolado e compactado para caber dentro da célula procariótica. A compactação do DNA se dá através da interação do DNA com diferentes proteínas condensadoras.

Apesar do tamanho do genoma dos procariotos ser menor do que o das células eucarióticas, existe maior densidade de genes nos cromossomos dos procariotos do que nos eucariotos. Isso porque, nos procariotos, ambas as fitas do DNA podem codificar um caminho metabólico ou um polipeptídio, e a organização do genoma dos procariotos permite que uma

mesma região do DNA possua mais de um gene regulado por promotores independentes. Além disso, a maioria dos genes presentes no genoma das células procarióticas está organizada como um conjunto de genes transcritos a partir de um mesmo promotor (embora a presença de promotores específicos para genes únicos também ocorra). Esse conjunto de genes é conhecido como operon: são constituídos, normalmente, por grupos de genes relacionados com um mesmo fenótipo. Sendo assim, diferentemente dos eucariotos, nos procariotos o RNA gerado a partir da transcrição gênica pode conter a informação de um único gene (RNA monocistrônico), como nos eucariotos, ou de um conjunto de genes (RNA policistrônico). Outra característica típica dos procariotos, e não encontrada nos eucariotos, é a colinearidade. Ou seja, nos procariotos existe equivalência entre a informação contida na sequência nucleotídica de um gene e a sequência de aminoácidos dos polipeptídeos. Isso se deve ao fato de que no genoma dos procariotos um gene não é composto por regiões codantes (exons) e não codantes (introns), como é encontrado nos eucariotos.

2.6.1. DNA Extracromossomal

Além do DNA cromossômico, muitos procariotos possuem um ou mais elementos genéticos de DNA extracromossomal, os plasmídeos. Estes últimos são pequenas moléculas de DNA de fita dupla, na maioria das vezes circulares, que possuem a capacidade de se replicar independentemente do cromossomo. O tamanho dos plasmídeos é variável e existem plasmídeos muito pequenos (menores que 2 kb) e plasmídeos muito grandes (maiores que 200 kb). Entretanto, nenhum é tão grande como o DNA cromossomal. Outra característica importante sobre plasmídeos e células procarióticas é que uma célula pode conter diferentes tipos de plasmídeos, e esses podem conter diferentes cópias dos mesmos dentro de uma célula. Por exemplo, o número de cópias de um plasmídeo por célula varia de acordo com o tipo e tamanho do plasmídeo. Geralmente plasmídeos grandes são encontrados com poucas cópias dentro de uma célula, enquanto alguns plasmídeos pequenos podem possuir várias cópias de si mesmo dentro de uma célula (Figura 2.16).

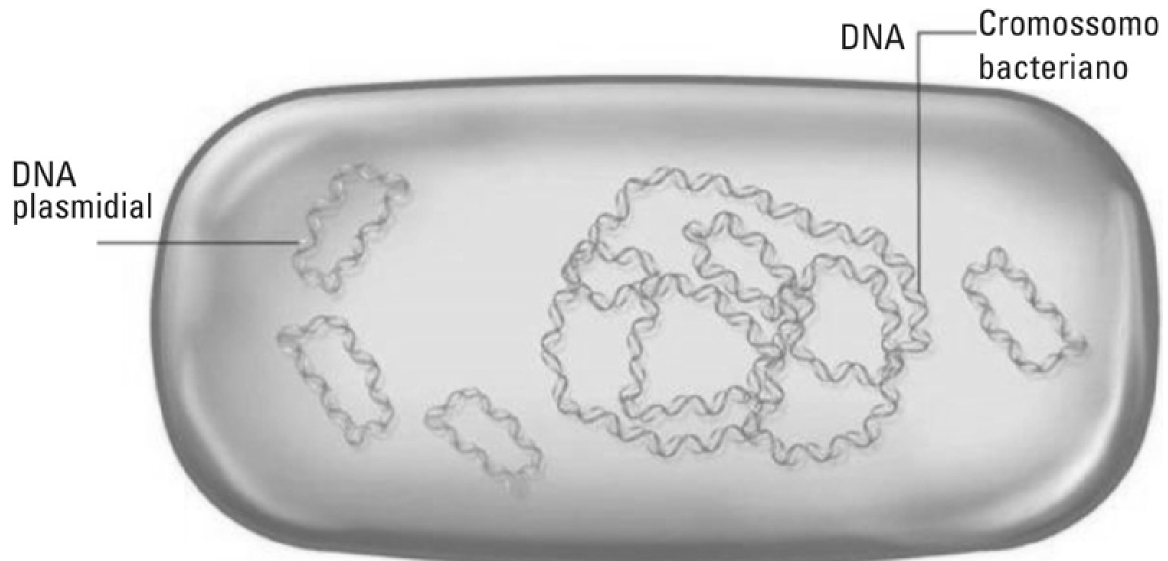


FIGURA 2.16 Esquema dos elementos genéticos cromossomial e extra-cromossomial (plasmídeo). *Fonte*: http://nepad-abne.net/biotechnology/process-of-developing-genetically-modified-gm-crops/commonly-used-plasmidsvectors/

Uma característica que diferencia o DNA cromossomal do DNA extracromossomal é que o último é conhecido como elemento genético acessório, pois não codifica nenhuma função essencial para o ciclo de vida celular. Por exemplo, a ausência de plasmídeos não afeta a viabilidade celular. Entretanto, muitos plasmídeos são conhecidos por possuírem genes que oferecem alguma vantagem adaptativa às células que os possuem, quando as mesmas são confrontadas com condições ambientais específicas. Um exemplo disso é que muitos plasmídeos possuem genes que codificam para a resistência de antimicrobianos. Sendo assim, na presença desses compostos, a presença do plasmídeo é muito importante para a viabilidade celular.

Como dito anteriormente, a presença de plasmídeos pode conferir às células que os possuem diferentes características fenotípicas, dentre elas a resistência a antimicrobianos, resistência a metais pesados, a produção de bacteriocinas, degradação de hidrocarbonetos e xenobiontes, entre outros. Entretanto uma característica apresentada por alguns tipos de plasmídeos merece destaque, que é a fertilidade (ou conjugação), ou seja, a capacidade que alguns plasmídeos possuem de transferir uma cópia do seu material genético de uma célula para outra célula procariótica. A conjugação é um dos mecanismos de transferência horizontal de genes entre procariotos, como veremos no próximo tópico.

2.6.2. Transferência de DNA entre procariotos

Os procariotos possuem diferentes mecanismos de transferência de genes e esses mecanismos justificam a disseminação de determinados fenótipos entre diferentes grupos de procariotos, mesmo entre procariotos pouco relacionados filogeneticamente. Existem três mecanismos de transferência de DNA: conjugação, transdução e transformação, como veremos adiante. Um dos pontos importantes dos mecanismos de transferência de genes é que, além de serem muito importantes para evolução dos procariotos, o conhecimento desses processos permitiu o desenvolvimento de diferentes ferramentas biotecnológicas (para mais detalhes, Snyder *et al*., 2013).

Todos os mecanismos de transferência de DNA são unidirecionais, partem de uma célula doadora para uma célula receptora. A transformação, que foi o primeiro mecanismo de transferência de genes descrito (em 1928 por Frederick Griffith), é um mecanismo onde células procarióticas capturam DNA livre no ambiente (liberados pela lise celular de alguma célula morta) e, através de mecanismos de recombinação homóloga, podem incorporar essa informação genética no seu próprio genoma. Nem todos os procariotos possuem a capacidade de incorporar DNA exógeno, e as espécies que realizam esse processo somente capturam DNA em determinados momentos do seu ciclo de crescimento (conhecido como estado de competência).

Na transdução o DNA da célula doadora é levado para a célula receptora através de bacteriófagos, que são vírus que infectam bactérias (Figura 2.17). Nem todos os bacteriófagos podem realizar a transdução e, além disso, como os bacteriófagos muitas vezes possuem hospedeiros específicos, a transdução geralmente só ocorre entre bactérias da mesma espécie ou de espécies relacionadas. Existem dois tipos de bacteriófagos, os líticos e os lisogênicos. A diferença básica entre eles é referente ao ciclo biológico dentro da célula hospedeira. Enquanto bacteriófagos do ciclo lítico infectam a célula e utilizam a maquinaria da célula hospedeira para a produção imediata de novas partículas virais, seguidas da lise da célula hospedeira e liberação das novas partículas fágicas, bacteriófagos do ciclo lisogênico podem integrar o seu DNA no cromossoma da célula hospedeira e ficar em estado quiescente. Nesse último caso, o DNA do fago será duplicado juntamente com o DNA da célula procariótica e será repassado às células-filhas. Entretanto, esse estado é reversível e, em determinado momento do ciclo de vida da célula procariótica, o DNA fágico pode se soltar do DNA procariótico e entrar no ciclo lítico (levando à formação de novas partículas fágicas).

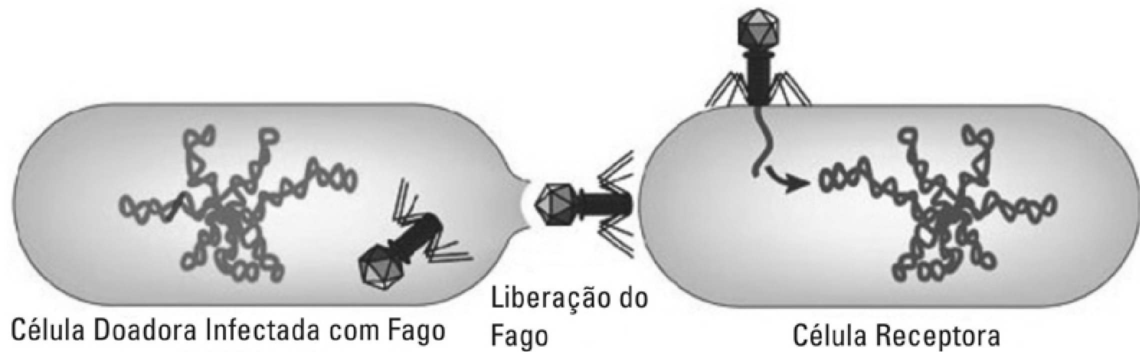


FIGURA 2.17 Esquema demonstrando o fenômeno da transdução bacteriana. *Fonte*: http://microbeonline.com/bacterial-genetics-mechanism-specialized-transduction/.

Tanto bacteriófagos do ciclo lítico como os do ciclo lisogênico podem realizar a transdução. Bacteriófagos do ciclo lítico realizam a transdução generalizada, onde qualquer pedaço do DNA de uma célula hospedeira pode ser transferido para uma nova célula hospedeira. Esses bacteriófagos, geralmente, durante o seu ciclo biólogico, degradam todo o DNA da célula hospedeira. Entretanto, em alguns casos, um erro durante a formação das novas partículas virais pode ocorrer e o DNA da célula hospedeira (ao invés do DNA fágico) pode ser empacotado dentro do capsídeo fágico, gerando uma partícula fágica transdutora (contendo DNA bacteriano ao invés do DNA fágico). Uma nova infecção de um hospedeiro por essa partícula transdutante pode levar a transferência horizontal de DNA, caso esse DNA seja incorporado no genoma da célula receptora via recombinação homóloga.

Por outro lado, a transdução por fagos lisogênicos é chamada de transdução especializada. Nesse caso, a transdução ocorre após um erro na excisão do DNA fágico do DNA da célula hospedeira. Esse erro leva à troca do material genético entre um pedaço do DNA da célula hospedeira e o DNA fágico, gerando uma partícula transdutora. Esse mecanismo do HGT é conhecido por transdução especializada porque somente as regiões adjacentes ao sítio de integração do DNA fágico com o DNA da célula hospedeira pode ser transduzido.

No último mecanismo de transferência horizontal de DNA, a conjugação, envolve o contato direto da célula doadora com a célula receptora, e ocorre independentemente de mecanismos de recombinação homóloga (Figura 2.18). A conjugação é mediada por plasmídeos específicos que codificam um complexo multiproteico (codificado pelos genes *tra*), conhecido como aparato de conjugação, que é a estrutura responsável por realizar o contato entre a célula doadora e a célula

receptora, além de ser a estrutura pela qual o DNA é transferido de uma célula para outra. Plasmídeos que codificam todo o aparato de conjugação são conhecidos como plasmídeos conjugativos.

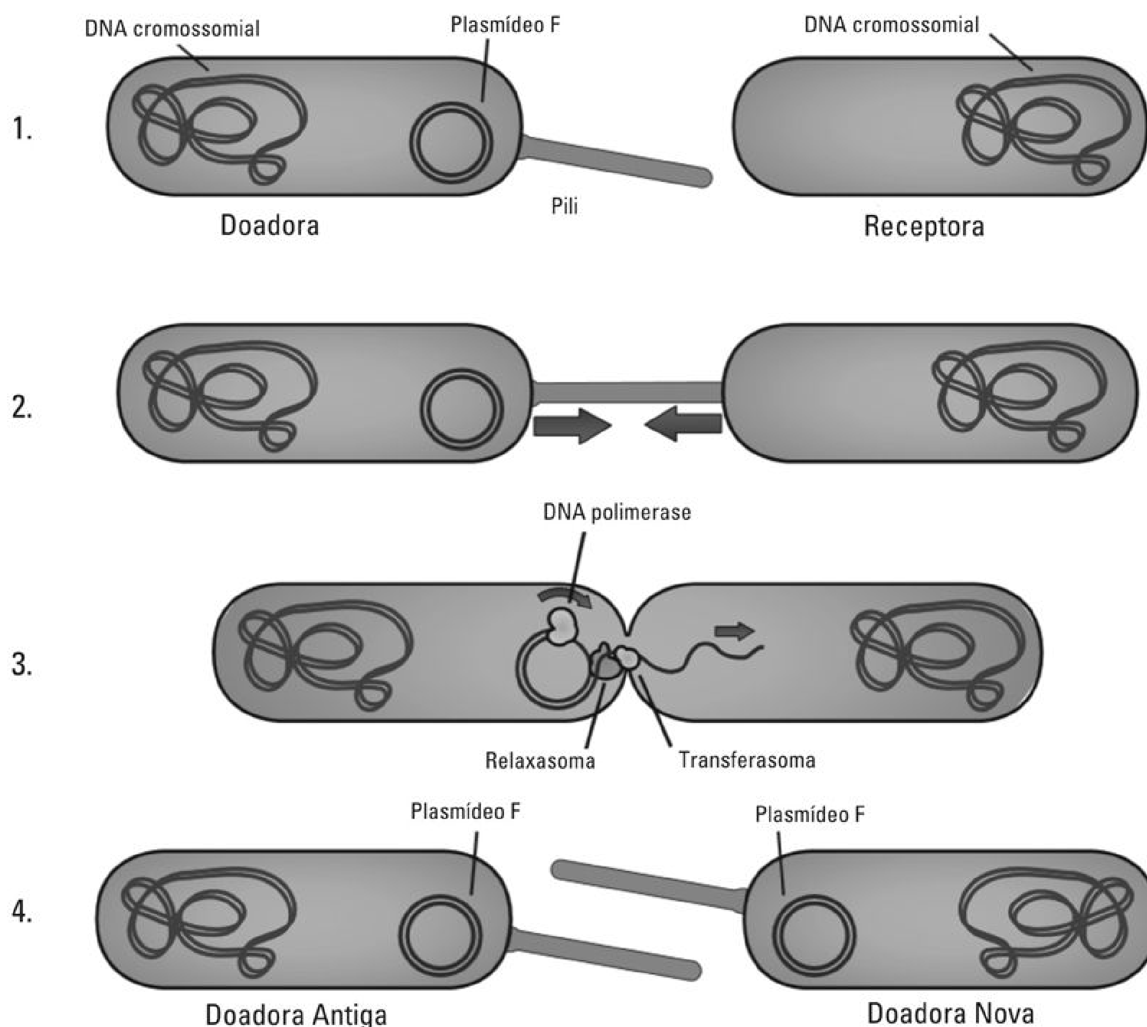


FIGURA 2.18 Esquema demonstrando o processo de conjugação entre bactérias. *Fonte*: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Conjugation.svg?uselang=pt-br.

A conjugação ocorre em duas etapas principais: formação do par de acasalamento entre a célula doadora e a célula receptora, e a transferência do DNA. Em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas a principal diferença da conjugação ocorre na etapa da formação do par de acasalamento. Enquanto em bactérias Gram-negativas a célula doadora reconhece a célula receptora através da presença de um pillus sexual (pillus do tipo IV), em bactérias Gram-positivas as células receptoras

secretam ferormônios que são reconhecidos pelas células doadoras, dando inicio à formação do par de acasalamento.

A conjugação tem muita importância na transferência de DNA entre procariotos porque não só plasmídeos conjugativos podem ser transferidos de uma célula doadora para uma célula receptora. Por exemplo, em algumas ocasiões, quando um plasmídeo conjugativo se encontra integrado com o DNA cromossomal, a conjugação leva a transferência de DNA cromossomal de uma célula doadora para uma célula receptora. Outros tipos de plasmídeos não conjugativos também podem ser conjugados quando presentes em uma célula contendo concomitantemente um plasmídeo conjugativo (para mais detalhes sobre a conjugação, Snyder *et al.*, 2013).

2.7. Aplicação em processos biotecnológicos

Devido à grande diversidade metabólica encontrada nas diferentes espécies de procariotos já descritas, e à facilidade de cultivo e/ou manipulação genética (como veremos nos capítulos posteriores), esses microrganismos são considerados ferramentas ideais para aplicação em etapas biotecnológicas. Na indústria de produção de alimentos, na indústria têxtil e na agricultura e limpeza de ambientes contaminados, diferentes processos microbianos são comumente utilizados.

Na indústria de alimentos: produção de produtos fermentados, como queijos, iogurtes, pães, vinhos, cervejas.

Na indústria têxtil, de detergente, entre outras: uso de enzimas produzidas por microrganismos (como proteases, amilases, lipases, celulases, xilanases e fitases) como alternativa a compostos químicos que podem ser prejudiciais ao ambiente.

Na agro-indústria: uso de biofertilizantes baseados na presença de espécies promotoras do crescimento de plantas, como procariotos que aumentam a biodisponibilidade de nitrogênio (realizam a fixação biológica do nitrogênio atmosférico), de fósforo (disponibilizam fosfato de origem orgânica e inorgânica), ferro (produzem sideróforos), entre outros.

Na biorremediação: uso de microrganismos com capacidade de degradar e/ou imobilizar diferentes compostos orgânicos e inorgânicos, que são poluentes ambientais, para a limpeza de locais contaminados.

Muitas espécies de procariotos, de diferentes filos e grupos taxonômicos, são utilizadas em processos biotecnológicos, como já citado anteriormente. Entretanto, neste capítulo serão destacadas características de alguns grupos bacterianos, como de actinobactérias e de bactérias do gênero *Bacillus,* devido ao amplo uso de bactérias desses grupos na biotecnologia.

2.7.1. Gênero *Bacillus* e gêneros correlatos

O gênero *Bacillus* sempre foi considerado um grupo taxonomicamente heterogêneo. Por muitos anos, todas as bactérias Gram-positivas em forma de bastonetes, formadoras de endósporos, aeróbias ou anaeróbias facultativas eram classificadas como membros do gênero *Bacillus*. A formação de endósporo foi, por muito tempo, uma das principais características consideradas na classificação da família Bacillaceae, o que

levou à classificação de 200 espécies no gênero *Bacillus* que foram, depois, reclassificadas por Gordon, Haynes e Pang (1973). Mesmo assim, até o início da década de 90, havia ainda cerca de 70 espécies dentro do gênero *Bacillus* com características genéticas e fenotípicas bastante variáveis, incluindo bactérias acidófilas, alcalinófilas, halófilas, quimiolitotróficas, psicrófilas e termófilas (Claus e Berkeley, 1986; Ash *et al.*, 1991; Priest, 1993; Joung e Cote, 2002).

Através das primeiras análises comparativas de sequências do 16S rDNA de 51 espécies do gênero *Bacillus* foi observada a formação de cinco grupos filogeneticamente distintos onde um grupo foi destacado dos demais. Este grupo passou a ser considerado um novo gênero: *Paenibacillus* (Ash, Priest e Collins, 1993). Mais tarde, novos gêneros foram criados a partir do gênero *Bacillus*. Dentre eles: *Halobacillus* (Spring *et al.*, 1996), *Brevibacillus* e *Aneurinibacillus* (Shida *et al.*, 1996), *Virgibacillus* (Heyndrickx *et al.*, 1998), *Gracilibacillus* e *Salibacillus* (Waino *et al.*, 1999), *Geobacillus* (Nazina *et al.*, 2001), *Marinibacillus* e *Jeotgalibacillus* (Yoon *et al.*, 2001), *Ureibacillus* (Fortina *et al.*, 2001) e *Oceanobacillus* (Lu, Nogi e Takami, 2001).

O gênero *Bacillus* é formado atualmente por 301 espécies e 7 subespécies descritas na literatura e apresentadas na *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (www.bacterio.net setembro/2015). Os microrganismos pertencentes a este gênero (Domínio Bacteria, Filo Firmicutes, Classe Bacilli, Ordem Bacillales, Família Bacillaceae, Gênero *Bacillus*) são formadores de endósporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos, Gram-positivos ou Gram-variáveis e geralmente possuem baixo conteúdo G+C em seu DNA. Estas bactérias geralmente produzem os endósporos como uma estratégia de sobrevivência a situações adversas do ambiente como, por exemplo, escassez de nutrientes, baixa umidade, mudança de temperatura e de pH. Os endósporos podem ser resistentes à radiação ultravioleta (UV), à temperatura, à desidratação e à ação enzimática. Além disso, eles podem ser de diversas formas (esférico, oval ou cilíndrico) e se localizarem em diferentes posições dentro da célula (central, subterminal ou terminal) como pode ser observado na Figura 2.19. As bactérias formadoras de endósporos no estado de dormência (esporulada) podem permanecer viáveis por longos períodos (muitos anos) até que as condições do ambiente se tornem favoráveis e estes esporos germinem dando início a um novo ciclo de vida da bactéria (Slepecky e Hemphill, 2006; Logan e De Vos, 2011; Mongkolthanaruk, 2012).

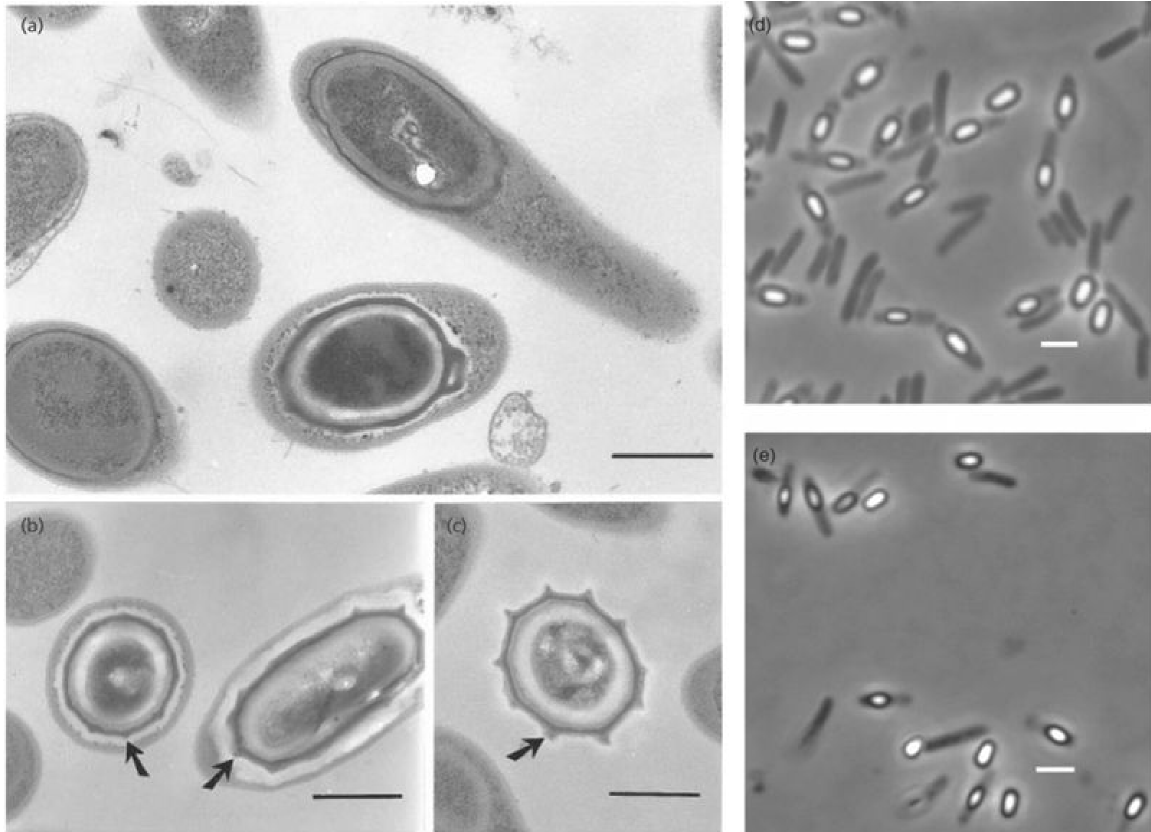


FIGURA 2.19 Células bacterianas produtoras de endósporos. A. Microscopia eletrônica de transmissão de *Paenibacillus borealis* KK19^T (a) células vegetativas e endósporos em estágios iniciais de maturação; (b) endósporos em fases posteriores de maturação; (c) endósporo maduro livre.
Fonte: Adaptado de Elo *et al*. (2001). Quebrar linha. **B.** Microscopia eletrônica de contraste de fase mostrando endósporos esféricos na posição subterminal de células de (d) *Paenibacillus cineris* e (e) *Paenibacillus cookii. Fonte*: Adaptado de Logan *et al.* (2014).

As espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* estão amplamente distribuídas na natureza, seu principal habitat é o solo, entretanto têm sido frequentemente isoladas a partir de diferentes ambientes como ar, água doce, água salgada, diferentes partes das plantas (raiz, caule e folha), animais e alimentos (Maughan e Van der Auwera, 2011). Diversas espécies do gênero *Bacillus* e gêneros correlatos (todos constituídos de bastonetes Gram-positivos, formadores de endósporos, aeróbios ou anaeróbios facultativos) como, por exemplo, *Alicyclobacillus*, *Amphibacillus*, *Aneurinibacillus*, *Brevibacillus*, *Fictibacillus*, *Filobacillus*, *Geobacillus*, *Gracilibacillus*, *Halobacillus*, *Jeotgalibacillus*, *Lysinibacillus*, *Marinibacillus*, *Oceanobacillus*, *Paenibacillus*, *Rummeliibacillus*, *Salibacillus*, *Ureibacillus*,

Virgibacillus e *Viridibacillus*, possuem um grande potencial para aplicação prática em diferentes áreas (Logan e De Vos, 2011; Maughan e Van der Auwera, 2011). O uso dos micro-organismos com o objetivo de aumentar a disponibilidade de nutrientes para as plantas é uma importante prática na agricultura, horticultura e recuperação de florestas e outros ambientes degradados. Muitos membros da ordem Bacillales possuem a capacidade de promover o crescimento de plantas diretamente através da solubilização e mineralização de fosfato, da produção de hormônios vegetais (auxinas, giberelinas e citocininas) e da fixação biológica do nitrogênio. Ou podem atuar indiretamente, protegendo contra fitopatógenos através da produção de substâncias antimicrobianas, redução do ferro disponível na rizosfera pela produção de sideróforos, produção de enzimas que lisam a parede de fungos e pela competição por sítios de ligação à raiz (Figueiredo *et al*., 2010; Glick, 2010; Logan e De Vos, 2011; Gupta, Bisaria e Sharma, 2015).

O gênero *Bacillus* é composto majoritariamente por bactérias ambientais cujo habitat principal é o solo onde possuem um papel importante na decomposição da matéria orgânica e na ciclagem de nutrientes (nitrogênio e carbono, por exemplo). Diversas espécies dos gêneros *Bacillus* e correlatos, como, por exemplo, *Bacillus pumilus*, *Paenibacillus terrae* e *Brevibacillus formosus,* possuem a capacidade de produzir enzimas como quitinase, amilase, celulase e xilanase que estão envolvidas na degradação de matéria orgânica no solo (Liang *et al*., 2014; Meena *et al*., 2014; Thomas *et al*., 2015). Outras espécies como *Paenibacillus polymyxa* têm um papel fundamental no ciclo do nitrogênio através da fixação biológica do nitrogênio atmosférico, ou seja, a conversão do nitrogênio atmosférico em amônia por bactérias simbióticas ou de vida livre tem grande importância para o ambiente e para a agricultura mundial. A disponibilidade de nitrogênio fixado é frequentemente um fator limitante para a boa produtividade de uma safra (Van Elsas, Jansson e Trevors, 2007; Brock *et al*., 2010; Logan e De Vos, 2011).

A biorremediação é definida como estratégia ou processo que utiliza micro-organismos ou suas enzimas na degradação, redução, eliminação ou transformação de um poluente no ambiente (solo, sedimento ou água). Bactérias pertencentes ao gênero *Bacillus*, como *B. subtilis*, *B. salamalaya*, *B. thuringiensis* são capazes de remover contaminantes derivados de atividades agrícolas como os pesticidas, metais pesados e derivados da indústria do petróleo diminuindo assim o risco de ocorrer impactos ambientais (Ismail e Dadrasnia, 2015; Jiang *et al*., 2015; Liu *et al*., 2015). As espécies *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. amyloliquefaciens* e *P. polymyxa* são

exemplos de excelentes produtores de biossurfactantes, que são moléculas produzidas por microrganismos capazes de diminuir a tensão superficial/interfacial na área de interação das fases ar-água ou água-óleo. Devido a essa característica, os biossurfactantes podem ser utilizados na biorremediação de áreas com ocorrência de derrame acidental de óleo, na recuperação secundária de óleo dos reservatórios, nas indústrias de produtos de limpeza (sabões e detergentes), de cosméticos e produtos de higiene (Banat *et al*., 2010; Alvarez *et al*., 2015; Liu *et al*., 2015).

As espécies pertencentes ao gênero *Bacillus* têm sido as mais utilizadas para aplicações industriais há muitos anos. Estas espécies são muito utilizadas por diversos motivos, dentre eles a alta taxa de crescimento, a capacidade de secretar proteínas para o meio extracelular e por serem geralmente consideradas seguras para sua utilização na indústria (Schallmey *et al*., 2004).

A espécie *B. subtilis* tem sido muito estudada devido à produção de diversas enzimas de interesse industrial como as queratinases, por exemplo. O grande volume de resíduo gerado pela indústria avícola (principalmente penas e peles) representa um sério problema ambiental no Brasil e no mundo devido à dificuldade de degradação desse material. Cedrola *et al.* (2012) isolaram uma estirpe SLC da espécie *B. subtilis* que foi capaz de produzir grandes quantidades da enzima queratinase que apresentou atividade em uma faixa de pH de 2 a 12 sendo o máximo da atividade em pH 10 e temperatura de 60°C. O extrato enzimático bruto obtido a partir do crescimento de *B. Subtilis* foi capaz de degradar queratina, gelatina, caseína e hemoglobina mostrando o potencial destes microrganismos para reciclar resíduos da indústria avícola (Cedrola *et al*., 2012).

2.7.2. Gêneros *Lactobacillus* e *Clostridium*

As espécies do gênero *Lactobacillus* (Domínio Bacteria, Filo Firmicutes, Classe Bacilli) são de grande relevância industrial, principalmente na área de microbiologia de alimentos e nutrição humana. Muitas espécies de lactobacilos são essenciais na produção de alimentos fermentados (iogurte, queijo, vinho, cerveja, leite fermentado) e também como fermentos ou conservantes de alimentos. Outras espécies são consideradas probióticas para seres humanos e vêm sendo estudadas na elaboração de vacinas (Salvetti *et al*., 2012). Esse gênero pode incluir um número elevado de espécies consideradas GRAS (Generally Recognized As Safe) dentro das bactérias láticas que compreendem um grupo funcional capaz de produzir

ácido lático por rota fermentativa, em condições anaeróbicas, a partir de hidratos de carbono.

Os membros do gênero *Lactobacillus* são bactérias Gram-positivas não formadoras de endósporos, sendo a maioria catalase negativa e quimioheterotróficos com formato que varia de bastonete (formato alongado) a cocobacilo (formato elipsoide), apresentam um genoma com teor de Guanina-Citosina (GC) baixo, não ultrapassando 59 mol% (Figura 2.20). Além do ácido lático, os membros desse gênero são capazes de produzir outros metabólitos como acetato, etanol, CO_2, formato e succinato (Cai *et al.*, 2012; Salvetti *et al.*, 2012). Os lactobacilos são considerados bactérias acidofílicas (crescem em ampla faixa de pH, variando entre 2,0 e 8,0) anaeróbicas aerotolerantes ou anaeróbicas,. A temperatura de crescimento pode variar de 2 a 53°C. As condições ótimas de crescimento geralmente são de 30 – 40°C em pH 5,5 – 6,2 (Hames e Vogel, 1995; Salvetti *et al.*, 2012).

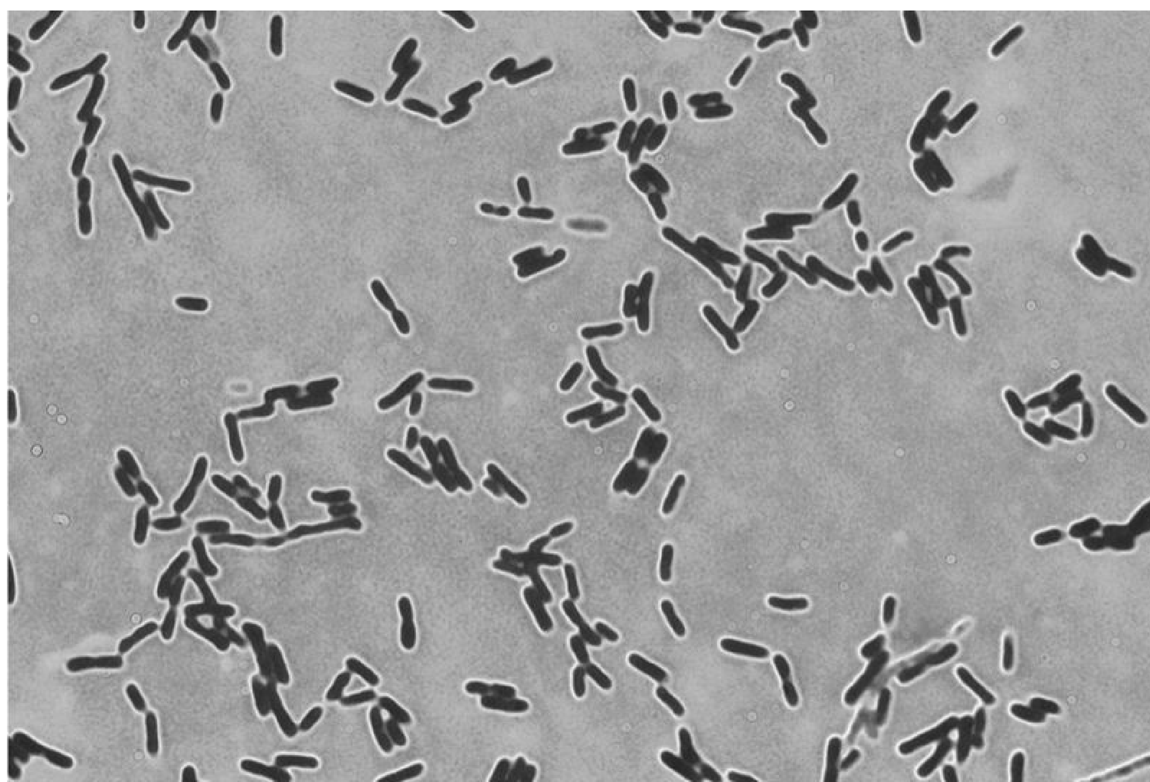


FIGURA 2.20 Microscopia óptica da bactéria *Lactobacillus* sp.
Fonte:
https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Lactobacillus#/media/File:Lattobacilli.jpg

Os lactobacilos são divididos em grupos taxonômicos distintos (Salvetti *et al.*, 2012):

(i) *Lactobacillus delbrueckii* (grupo de maior relevância composto por 27 espécies, sendo 20 homofermentativas e 6 heterofermentativas facultativas e 1 heterofacultativa obrigatória).

(ii) *Lactobacillus salivarius* (grupo composto por 25 espécies, sendo 16 homofermentativas e 9 heterofermentativas facultativas capazes de produzir ácido L+ ou D- lático).

(iii) *Lactobacillus reuteri* (grupo composto por 15 espécies, sendo 13 heterofermentativas facultativas e 2 obrigatórias capazes de produzir ácido L+ ou D- lático).

(iv) *Lactobacillus buchneri* (grupo composto por 12 espécies, sendo heterofermentativas facultativas e obrigatórias capazes de produzir ácido L+ ou D- lático).

(v) *Lactobacillus alimentarius* (grupo composto por 10 espécies, podendo ser heterofermentativas facultativas ou obrigatórias, capazes de crescer na presença de 5 a 10% de NaCl).

(vi) *Lactobacillus brevis* (grupo composto por 10 espécies, podendo ser heterofermentativas facultativas ou obrigatórias, capazes de crescer na presença de 5 a 10% de NaCl. A espécie *L. koreensis* apresenta motilidade).

(vii) *Lactobacillus collinoides* (grupo composto por 5 espécies, podendo ser heterofermentativas capazes de produzir ácido L+ ou D- lático).

(viii) *Lactobacillus fructivorans* (grupo composto por 5 espécies, podendo ser heterofermentativas obrigatórias).

(ix) *Lactobacillus plantarum* (grupo homogêneo composto por 5 espécies de Lactobacillus heterofermentativos facultativos).

(x) *Lactobacillus sakei* (grupo composto por 4 espécies, podendo ser heterofermentativas facultativas, com algumas espécies capazes de produzir amônia a partir de arginina e acetoína).

(xi) *Lactobacillus casei* (grupo homogêneo composto por 3 espécies, podendo ser heterofermentativas facultativas, capazes de produzir acetoína e ácido L+ ou D- lático).

(xii) *Lactobacillus coryniformis* (grupo homogêneo composto por 3 espécies, podendo ser heterofermentativas facultativas, capazes de produzir ácido L+ ou D- lático e não produzem amônia a partir de arginina).

(xiii) *Lactobacillus manihotivorans* (grupo composto por 3 espécies, podendo ser homofermentativas, capazes de produzir somente ácido L+, sendo as únicas espécies capazes de crescer em pH 8,0).

(xiv) *Lactobacillus perolens* (grupo composto por 3 espécies, podendo ser heterofermentativas facultativas ou obrigatórias, capazes de produzir ácido L+).

(xv) *Lactobacillus vaccinostercus* (grupo composto por 3 espécies, podendo ser heterofermentativas obrigatórios).

A maioria das espécies de *Lactobacillus* pode ser utilizada como probióticas. Probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde. Dentre essas espécies probióticas, destacamos *L. acidophilus*, que já vem sendo utilizado para fins alimentares, adicionado em iogurtes e leites fermentados (Figura 2.21). Mais de 50% dos diferentes rótulos de iogurte que são produzidos contêm essa bactéria. *L. acidophilus* também faz parte da microbiota oral, intestinal e vaginal.

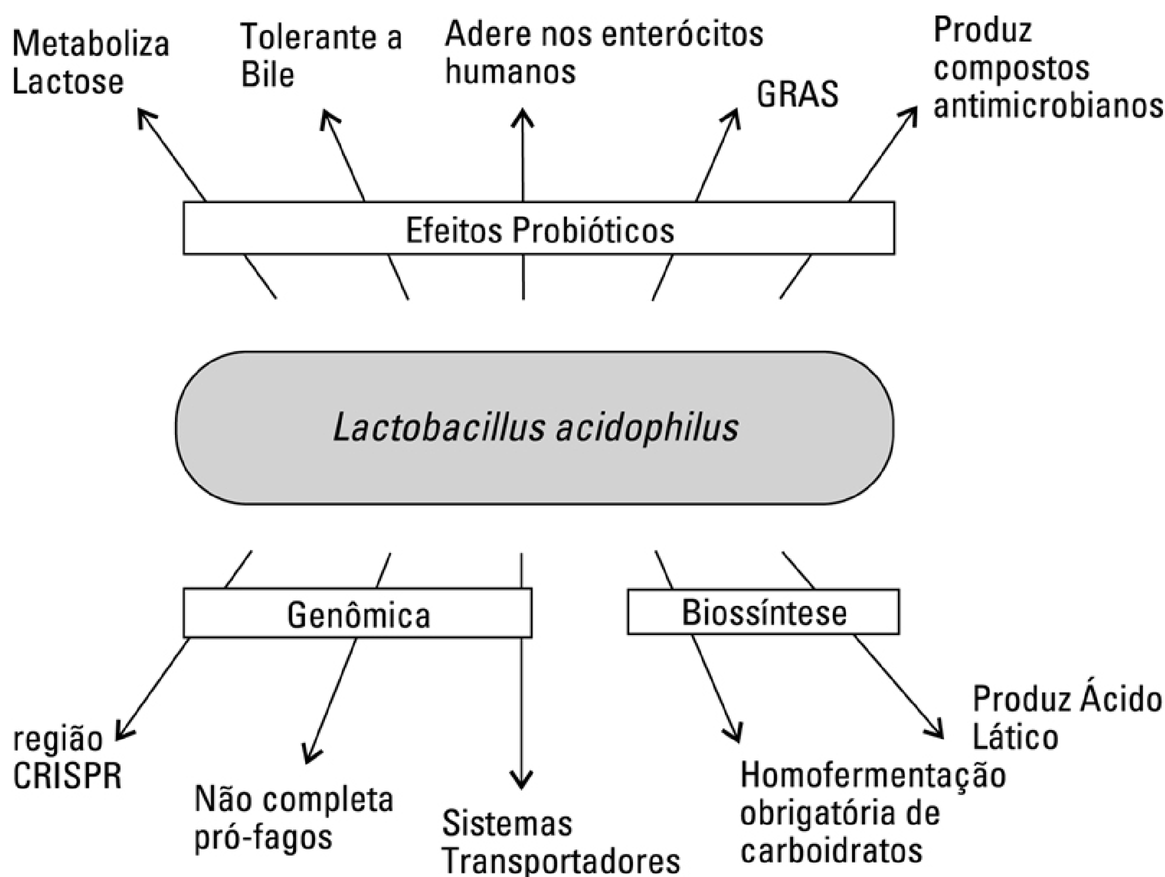


FIGURA 2.21 Características probióticas, biossintéticas e genômicas de *L. acidophilus*. *Fonte*: Adaptado de de Bull *et al.* (2013).

Outro potencial uso dos lactobacilos é na produção de queijo emental. A espécie *Lactobacillus bugaricus*, presente naturalmente no leite, também é

considerada uma bactéria probiótica produtora de ácido lático. Durante o processo fermentativo na produção de queijo suíço emental, outra bactéria também contribui para a maturação do queijo, a *Propionibacterium shermanii*. Essa bactéria produz ácido propiônico e CO_2, responsáveis pelos famosos “buracos” (CO_2) no queijo e também pela aromatização do queijo (ácido propiônico). Alem disso, a *P. shermanii* também produz vitaminas, como a vitamina B12.

O gênero *Clostridium* (Figura 2.22) é um dos gêneros anaeróbicos mais importantes dentre as bactérias, sendo de grande relevância médica e industrial. São bastonetes formadores de endósporos que medem entre 0,3-2,0 μm de diâmetro podendo se apresentar aos pares ou em cadeias curtas com as extremidades arredondadas ou pontiagudas. Geralmente são bactérias Gram-positivas, quando em cultivo jovem, podendo apresentar motilidade por flagelos peritríquios. A maioria das espécies é quimiorganotrófica, podendo haver espécies quimioautotróficas. Apresentam um metabolismo versátil capaz de produzir diferentes enzimas hidrolíticas (celulases, peptidases) e também uma mistura de ácidos orgânicos e álcoois. Uma das aplicações biotecnológicas mais importantes do gênero *Clostridium* está relacionada com a fermentação Acetona-Butanol-Etanol (fermentação ABE). Atualmente, as principais linhagens produtoras de butanol e acetona são pertencentes à espécie *Clostridium acetobutylicum*. Contudo, existem outras espécies, como *C. butyricum*, *C. tyrobutyricum*, *C. thermobutyricum*, *C. Beijerinckii*, que são capazes de produzir compostos como lactato, etanol e isopropanol (Tigunova *et al.,* 2013). No que diz respeito às enzimas hidrolíticas, a espécie *C. acetobutylicum* é capaz de produzir α-amilases quando crescida em meios contendo amido como única fonte de carbono, permitindo a conversão direta do amido em maltose e glicose (Al-Shorgani *et al.,* 2012). Outra espécie de grande relevância para produção de enzimas de interesse industrial é a *C. histolyticum*, capaz de produzir a enzima colagenase. As colagenases são metalopeptidases com um domínio de ligação a zinco característico, capazes de hidrolizar os diferentes tipos de colágeno. Sua principal aplicação é no auxílio da cicatrização de queimaduras e feridas de pele.



FIGURA 2.22 Microscopia óptica ilustrando o aspecto morfológico do gênero *Clostridium*. *Fonte*: https://commons.wikimedia.org/wiki/Category:Clostridium_septicum#/media/File:Clostridium_septicum_01.jpg.

Bactérias do gênero *Clostridium* se destacam dentro do universo das bactérias anaeróbicas capazes de degradar polímeros vegetais. Essas bactérias são capazes de secretar um complexo multienzimático denominado celulossoma, capaz de converter a celulose em celobiose e celodextrinas (Gaida *et al.*, 2016). Um exemplo clássico é o *C. cellulolyticum*, capaz de crescer na estrutura cristalina da celulose, produzindo mais de 90 glicosil hidrolases (GH) de diferentes famílias. Outra espécie capaz de degradar celulose é a *C. thermocellum*. Conhecido como o mais eficiente

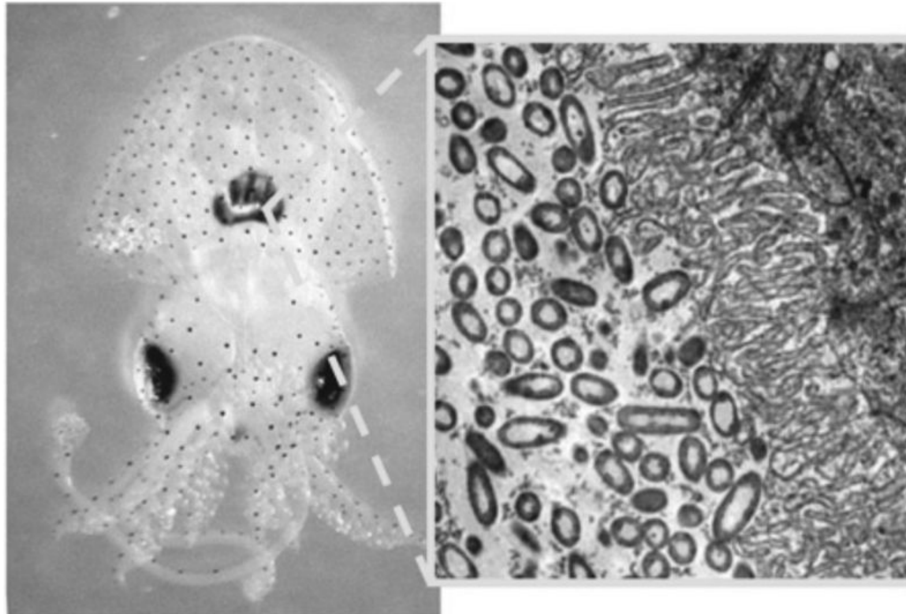
degrador de fibra de celulose cristalina, *C. thermocellum* parece ser uma bactéria ubíqua com um papel importante na mineralização da biomassa vegetal, bem como nos bioprocessos para produção de biogás (Koeck *et al.,* 2015). *C. thermocellum* é capaz de produzir as três enzimas do complexo celulolítico: endoglucanase, exoglucanase e β-glucosidase (Kim e Gadd, 2008). O complexo celulossoma de *C.thermocellum* é o sistema celulolítico mais eficiente descoberto até o momento em anaeróbicos. Contendo cerca de 70 enzimas, o celulossoma apresenta atividade enzimática de celulases, xilanases e pectinases (Koeck *et al.,* 2015). Os celulossomas podem ser encontrados também em outras bactérias anaeróbicas, por exemplo, *Acetivibrio cellulolyticus*, *Clostridium cellobioparum*, *Clostridium cellulovorans*, *Ruminococcus albus*, e *Ruminococcus flavefaciens* (Blume *et al.,* 2013).

2.7.3. Outros gêneros de bactérias

Várias espécies bacterianas apresentam potencial biotecnológico, destacando as espécies dos gêneros *Vibrio, Pediococcus*, *Leuconostoc, Acetobacter*, *Gluconobacter*, *Escherichia coli*, *Streptococcus*, *Agrobacterium*, *Thiobacillus*, entre outros.

As bactérias pertencentes ao gênero *Vibrio* são bastonetes curvos Gram-negativos comumente encontrados em ambiente marinho. Algumas espécies de *Vibrio* são relacionadas com doenças em organismos marinhos (corais, camarões, moluscos e esponjas) e em seres humanos (por exemplo, *V. cholerae*). Seus fatores de virulência envolvem a produção de enzimas hidrolíticas, como as peptidases, lipases e quitinases (Gupta *et al.,* 2004; Kadokura *et al.,* 2007; Zhang *et al.,* 2007; Sussman *et al.,* 2009). Essas bactérias desempenham um importante papel em termos ecológicos, médicos e industriais. Um dos principais problemas que algumas espécies de *Vibrio* (*V. harveyi*, *V. hispanicus*, *V. mediterranei*, *V. shiloi*) causam no ambiente marinho é o embranquecimento dos corais, o que, em casos mais avançados de infecção, pode levar o organismo à morte (Thompson *et al.,* 2005). Assim, visando avaliar o potencial das diferentes espécies de *Vibrio*, estudos de prospecção biotecnológica vêm sendo desenvolvidos, correlacionando seu potencial enzimático e seu potencial bioluminescente com aplicações industriais. A bactéria *Vibrio fischerii* vive em ambientes marinhos e em associação com animais marinhos (abrigadas em órgãos emissores de luz) como lula e peixes, sendo capaz de realizar o fenômeno da bioluminescência. Uma associação simbiótica bem estudada é a observada entre a lula havaiana rabo-de-prumo e o *V. fischerii* (Figura 2.23).

A bioluminescência é a emissão de luz fria e visível por organismos vivos, podendo ocorrer de forma livre nos oceanos (bactérias bioluminescentes) ou na presença de organismos como moluscos e peixes (em associação com bactérias), servindo de comunicação biológica. A reação da bioluminescência se dá quando a enzima luciferase atua no substrato luciferina, na presença de oxigênio e ATP, gerando oxiluciferina e luz. A importância ecológica da *V. fischerii* está em auxiliar a comunicação biológica entre organismos (peixes, moluscos) tanto para o acasalamento como para alimentação (atração de presas em ambientes com sem luminosidade, como as fossas abissais).



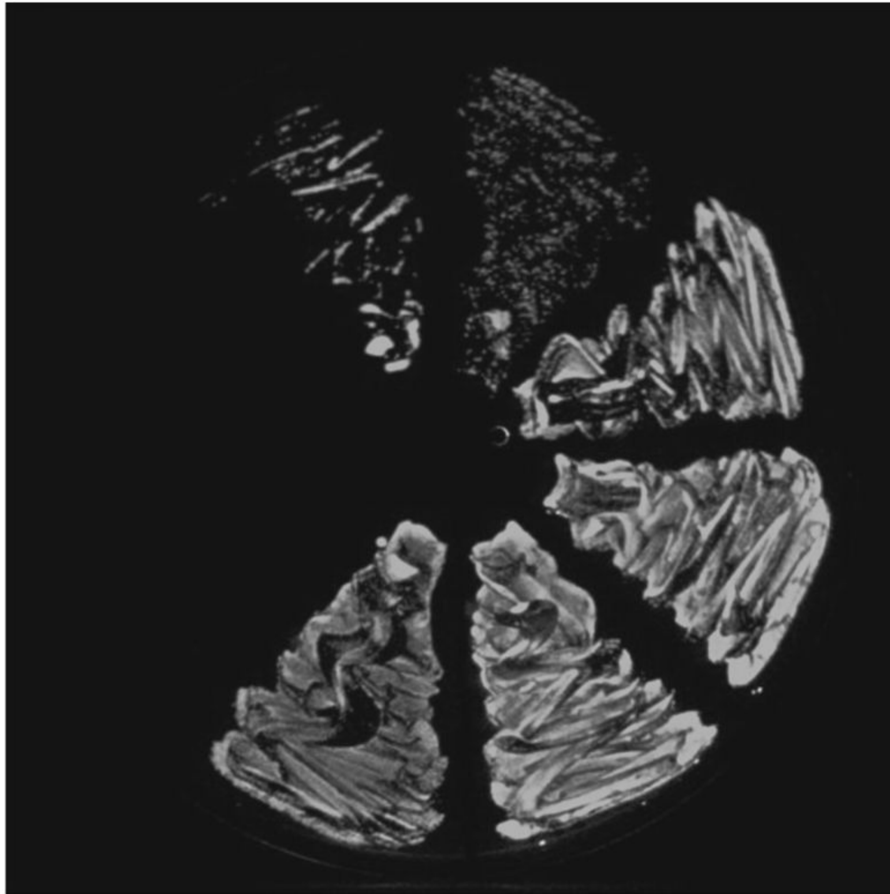


FIGURA 2.23 **Aspectos da bactéria bioluminescente *V. fischerii*. A. Associação simbiótica entre a lula havaiana rabo-de-prumo (esquerda) e a bactéria *V. fischerii* (direita). B.**

Crescimento em meio sólido da bactéria bioluminescente. *Fonte*: http://jgi.doe.gov/why-sequence-vibrio-fischeri/.

Como forma de aproveitar o potencial biotecnológico de bactérias bioluminescentes, algumas empresas vêm investindo na construção de luminárias biossustentáveis. A empresa Phillips® criou o conceito de "Microbial Home", no qual cultiva bactérias bioluminescentes em frascos de vidro e utiliza como bio-lâmpada (Figura 2.24). A bactéria (*V. fischerii*) é suspensa em um caldo nutritivo que é fornecido por biorreatores, em condições assépticas. A luz gerada não é forte suficiente para iluminar um ambiente.

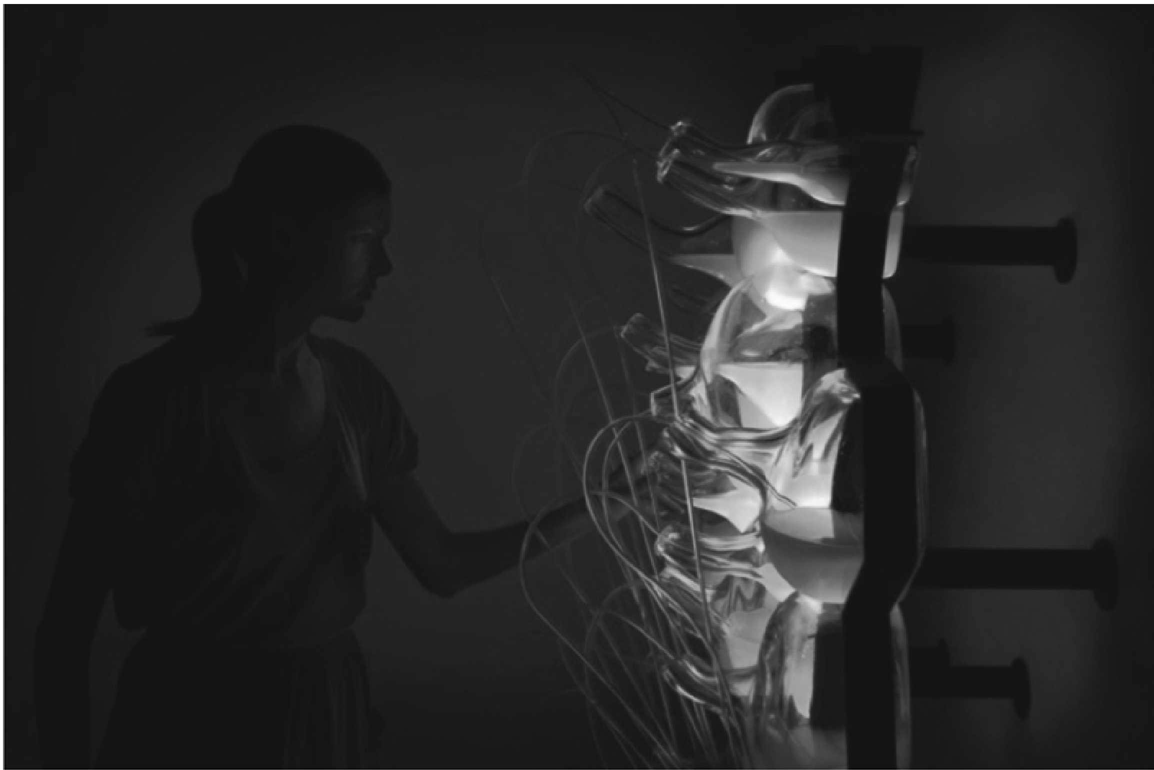


FIGURA 2.24 Exemplo de biolâmpadas utilizando bactérias bioluminescentes. *Fonte*: http://robotmonkeys.net/tag/lamps/.

Outro grupo de bactérias anaeróbicas com potencial para aplicação biotecnológica são as produtoras de ácido succínico. Dentre elas destacamos *Mannheimia succiniciproducens*, *Escherichia coli*, *Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succiniproducen*, sendo esta última, Gram-negativa estritamente anaeróbica, considerada uma das mais eficientes na produção do ácido succínico (Zeikus *et al.*, 1999). Outras espécies também

são capazes de produzir ácido succínico, como *Ruminococcus flavefaciens*, *Succinimonas amylolytica*, *Succinivibrio dextrinisolvens*, *Cytophaga succinicans*, *Bacteroides amylophilus*, *Prevotella ruminicola* e *Wolinella succinogenes* (Okino *et al.*, 2008). Algumas dessas bactérias podem ser encontradas no rúmen enquanto outras podem ser encontradas no ambiente. O ácido succínico (ou butanodioico), produzido como um dos principais produtos no processo fermentativo anaeróbico de algumas bactérias, pode ser considerado um bloco de construção de grande importância na produção de ácido adípico, estimulantes para crescimento de plantas, ingredientes antibióticos, surfactantes, vitaminas e solventes verdes (Zeikus *et al.*, 1999; Mckinlay *et al.*, 2007).

Os membros do gênero *Pediococcus* são bactérias Gram-positivas, catalase negativas, oxidase negativa, produtoras de ácido lático, que crescem preferencialmente em condições anaeróbicas ou em baixa tensão de oxigênio (microaerofilia). As principais espécies deste gênero são *P. acidilactici*, *P. damnosus*, *P. pentosaceus*. Essas bactérias são responsáveis pela fermentação homolática, utilizando glucose e gluconato como fontes de carbono, de diversos alimentos que são consumidos pelos seres humanos (*sauerkraut*) e animais (silagem). Nesses processos de fermentação, os açúcares presentes nos vegetais frescos são fermentados em ácido lático, acidificando os produtos, e consequentemente impedindo a sua posterior degradação, mantendo seu alto valor nutricional. A morfologia destas células constitui-se de formas esféricas em arranjo tétrade (Figura 2.25). As bactérias desse gênero são normalmente encontradas nos mesmos habitats em que encontramos as bactérias dos gêneros *Lactobacillus*, *Leuconostoc* e *Weissella* spp. como plantas em geral e material vegetal fermentado, podendo também ser encontradas no trato gastrointestinal de animais de sangue quente (Dicks e Endo, 2014). A presença de bactérias do gênero *Pediococcus* é importante para o desenvolvimento de uma boa fermentação secundária na cerveja estilo LAMBIC. Algumas linhagens de *Pediococcus* são capazes de produzir o composto diacetil, importante elemento em cervejas e vinhos, que confere um gosto ligeiramente amanteigado, quando em concentrações inferiores a 0,10 ppm.

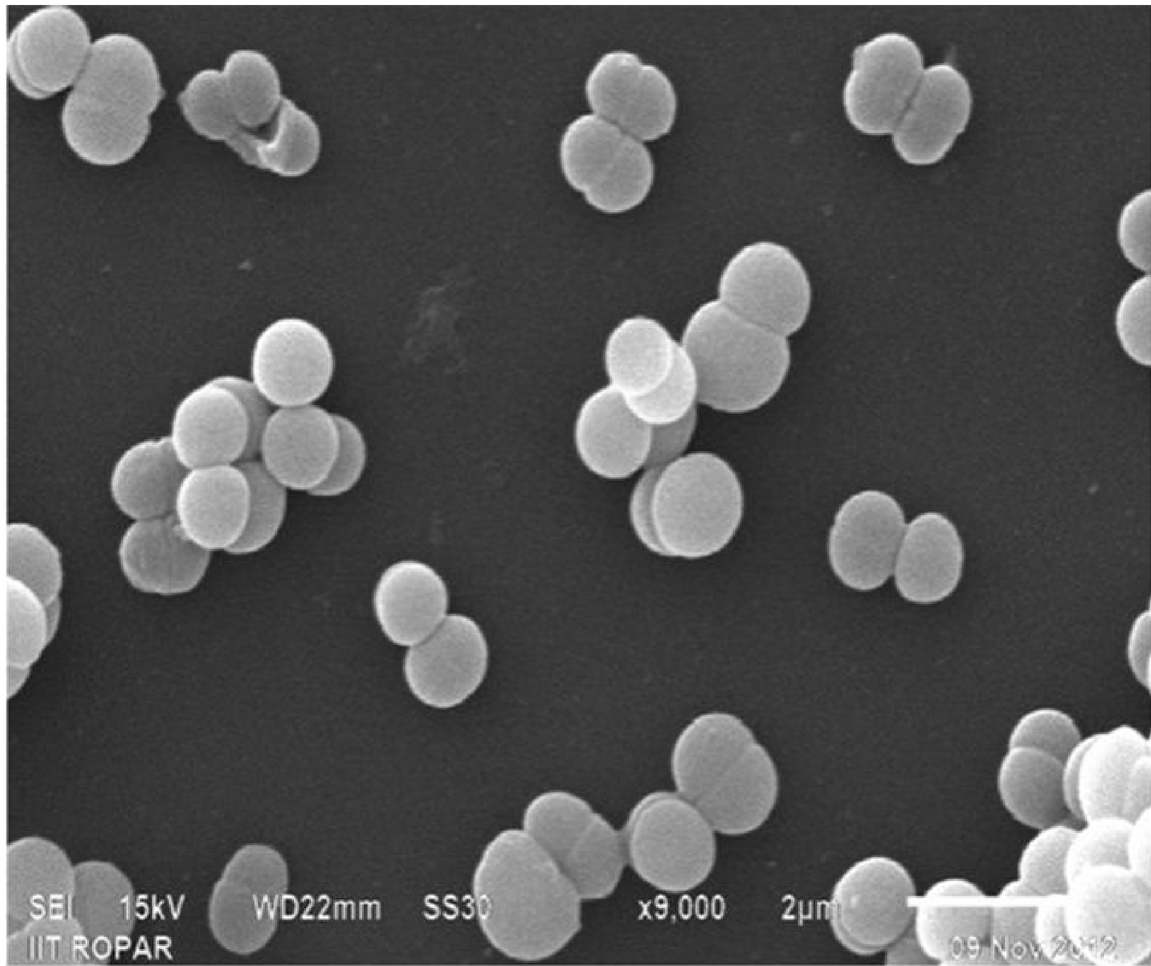


FIGURA 2.25 Aspectos morfológicos da bactéria *Pediococcus acidilactici.* *Fonte*: Balgir *et al.* (2013).

As bactérias produtoras de ácido acético pertencem à Classe ⟨-Proteobacteria, família Acetobacteraceae, podendo ser Gram-negativas ou Gram-variáveis, com morfologia que varia de elipsoide a alongada, caracterizando um estado de pleomorfismo celular (Figura 2.26). Algumas delas são mesofílicas e podem apresentar motilidade (presença de flagelos). Estão adaptadas a crescer numa faixa de pH variando de 3,0 a 6,0 e podem ser encontradas em ambientes com teores de açúcar e álcool ligeiramente elevados, pouco ácidos, como em algumas frutas, bebidas fermentadas (cerveja, vinho e cidra) e vinagre. Os principais gêneros de bactérias acéticas são *Acetobacter*, *Gluconobacter* e *Gluconacetobacter*, sendo capazes de utilizar o etanol como substrato para a produção de ácido acético. As bactérias acéticas desempenham um papel importante na indústria de alimentos, em especial na produção de vinagre (principal produto), chocolate (fermentação acética após fermentação alcoólica das amêndoas do cacau), vinho (*Gluconobacter oxydans* é a principal espécie

consumidora de açúcares na fase inicial, e depois prevalecem as bactérias *Acetobacter* e *Gluconoacetobacter* que consomem o etanol, o que não é desejado) (Du Toit e Lamberchts, 2002; Benito, 2005; Raspor e Goranovič, 2008; Guillamón e Mas, 2009). Além destes produtos, as bactérias acéticas podem ser utilizadas na produção de diferentes compostos de interesse biotecnológico, como celulose bacteriana (*Gluconacetobacter hansenii*) um biopolímero com propriedades biomédicas que já vem sendo utilizado na medicina como membrana de hemodiálise e pele artificial para auxiliar a cicatrização de queimaduras, e também na produção de L-ácido ascórbico, ácido chiquímico, sorbose e sorbitol (Raspor e Goranovič, 2008; Guillamón e Mas, 2009).



FIGURA 2.26 Microscopia eletrônica de varredura de *Acetobacter aceti*, bactéria produtora de ácido acético. *Fonte*: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Acetobacteraceti.jpg?uselang=pt-br.

No caso da fermentação do cacau para produção do chocolate, primeiramente a parte polissacarídica do fruto do cacau encontrada nas

amêndoas é fermentada por leveduras, gerando etanol. Após esta etapa, as bactérias acéticas (*Acetobacter*) fermentam o etanol produzido, convertendo-o em ácido acético. Esta etapa é muito importante pois o ácido acético atua no tegumento da amêndoa, tornando-o mais poroso e permitindo o acesso de enzimas que vão atuar no interior da semente e promover a liberação dos compostos aromáticos, que conferem o aroma característico do cacau.

Outro grupo de bactérias com relevância ambiental e industrial são as Bactérias Redutoras de Sulfato (BRS). As BRS constituem um grupo microbiano heterogêneo no qual se incluem espécies anaeróbicas do domínio Bacteria e do domínio Archaea, desempenhando um papel fundamental na ciclagem biogeoquímica do enxofre e do carbono (CASTRO; WILLIAMS; OGRAM, 2000). São encontradas em diferentes habitats, como sedimentos de ambientes marinhos e dulcícolas, no próprio solo e também em áreas petrolíferas (MILETTO, BODELIER, LAANBROEK, 2007; MUYZER, STAMS, 2008; GITTEL et al., 2009). Os mecanismos de obtenção de energia pelas BRS incluem a redução desassimilativa de sulfato, utilizando o sulfato como aceptor final de elétrons durante o consumo da matéria orgânica, liberando sulfeto como produto metabólico. Assim, o íon atua como agente oxidante para metabolização da matéria orgânica e uma pequena parcela do enxofre reduzido será assimilada pelas BRS, enquanto que a maior parte é excretada na forma de íon sulfeto normalmente hidrolisado a sulfeto de hidrogênio livre (ROSARIO, 2014). As BRS vêm sendo consideradas como os principais microrganismos responsáveis pelo processo de biocorrosão, provocando quase que a metade de todas as ocorrências de falhas biocorrosivas já descritas até o momento (JAVAHERDASHTI, 1999; WANG et al., 2015). As colônias de BRS se fixam em superfícies inertes através da secreção de exopolissacarídeos (EPS), permitindo a geração de um biofilme. Uma vez fixadas, as BRS iniciam o processo de despolarização catódica através da ação da enzima hidrogenase, produzida pelas BRS, permitindo o consumo do hidrogênio catódico, e consequentemente acelerando a oxidação do metal (WANG et al., 2015).

2.8. Actinobactérias: classificação, aspectos morfofisiológicos

2.8.1. Classificação

As actinobactérias compreendem atualmente um dos principais filos do Domínio Bacteria, onde são subdivididos em cinco classes. Destas, a classe *Actinobacteria* é a mais importante e compõe cerca de 90% de todos os gêneros do filo, com 15 ordens, 43 famílias e 203 gêneros (Goodfellow, 2012). No entanto, é interessante ressaltar que a cada ano são apresentadas na literatura novas propostas de novas espécies, gêneros ou famílias e, portanto, a classificação destes microrganismos se encontra em constante renovação.

As actinobactérias (Goodfellow e Findley, 2010) compreendem bactérias Gram-positivas ou Gram-variáveis, aeróbias, anaeróbias facultativas ou anaeróbias estritas. A maioria é quimiorganotrófica e cresce a pH neutro, mas algumas são acidofílicas ou alcalofílicas. Outras são halofílicas. A maioria é mesofílica, podendo ser ainda termofílicas, ou termotolerantes. São em geral saprofíticas, mas algumas são patogênicas para animais e plantas. O conteúdo de G+C do DNA varia de 50 a mais de 70% (Goodfellow, 2012).

Os membros deste táxon possuem uma morfologia bastante variada, que vai de cocos (por exemplo, *Micrococcus*) até bastonetes curtos (por exemplo, *Mycobacterium*), ou micélio que fragmenta em formas cocoides ou de bastonetes (por exemplo, *Nocardia*). Porém a forma mais comum e mais conhecida é a do gênero *Streptomyces,* que cria um micélio vegetativo ramificado estável a partir do qual se forma uma hifa aérea, que se diferencia em cadeias curtas ou longas de esporos. Espécies desse gênero têm como uma de suas principais características possuírem um índice G+C bem elevado, entre 66 e 78% (Kampfer, 2012)

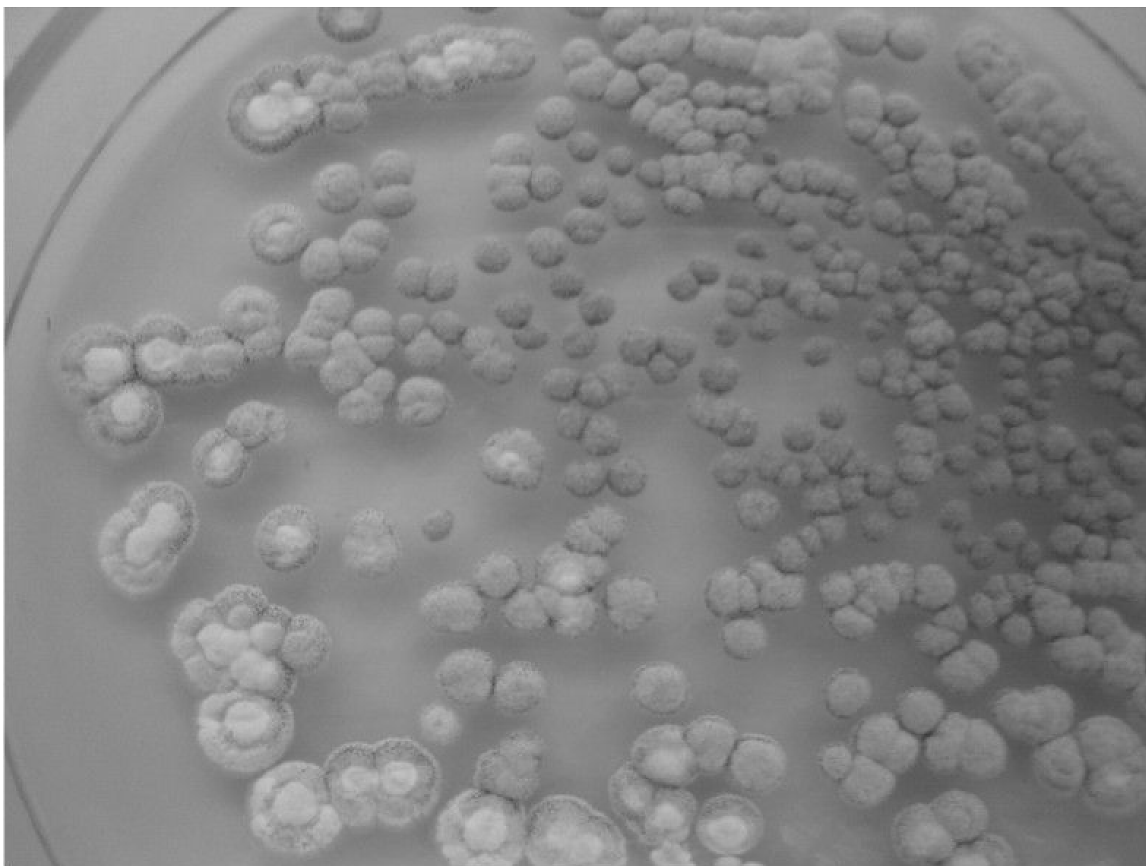
Estes microrganismos estão amplamente distribuídos em ambientes naturais, sendo o solo o seu reservatório mais comum. Mas podem ser facilmente encontrados também em águas de rios e mares, e ainda na atmosfera. Além disso, também estão presentes em ambientes antropogênicos, ou seja, aqueles transformados pelo homem, como resíduos sólidos municipais, esgotos municipais e efluentes industriais. Estão presentes ainda em processos de compostagem.

Entre os seres procarióticos, os membros da classe *Actinobacteria*, notadamente cepas do gênero *Streptomyces*, são a fonte mais rica de produtos naturais, especialmente antibióticos de interesse clínico, antimetabólitos e agentes antitumorais (Bérdy, 2005; Newman e Cragg, 2007; Olano *et al.*, 2009), bem como de enzimas (Coelho e Nascimento, 2008). Assim sendo, em termos de aplicação industrial, e de abundância, a ordem *Streptomycetales* é uma das mais importantes dentro da classe *Actinobacteria*. Essa ordem possui apenas uma família, a *Streptomycetacea*, com o gênero *Streptomyces* compreendendo 533 espécies (Kampfer, 2012).

2.8.2. Morfologia

A célula das actinobactérias corresponde a uma célula procariótica típica, contendo uma região nuclear fibrilar (DNA) e um citoplasma granular com ribossomos e retículo endoplasmático, podendo conter ainda várias outras inclusões, dependendo do organismo, da sua idade e do meio de crescimento onde se encontra. O citoplasma é envolto por uma membrana citoplasmática unitária, e possui também a parede celular de peptidoglicana, típica das bactérias Gram-positivas (Locci e Sharples, 1984).

As colônias dos estreptomicetos compreendem uma massa de hifas que compõe o micélio, geralmente com aspecto macroscópico de “pó de giz”, ressecadas, endurecidas, bem fixas ao ágar (Figura 2.27).



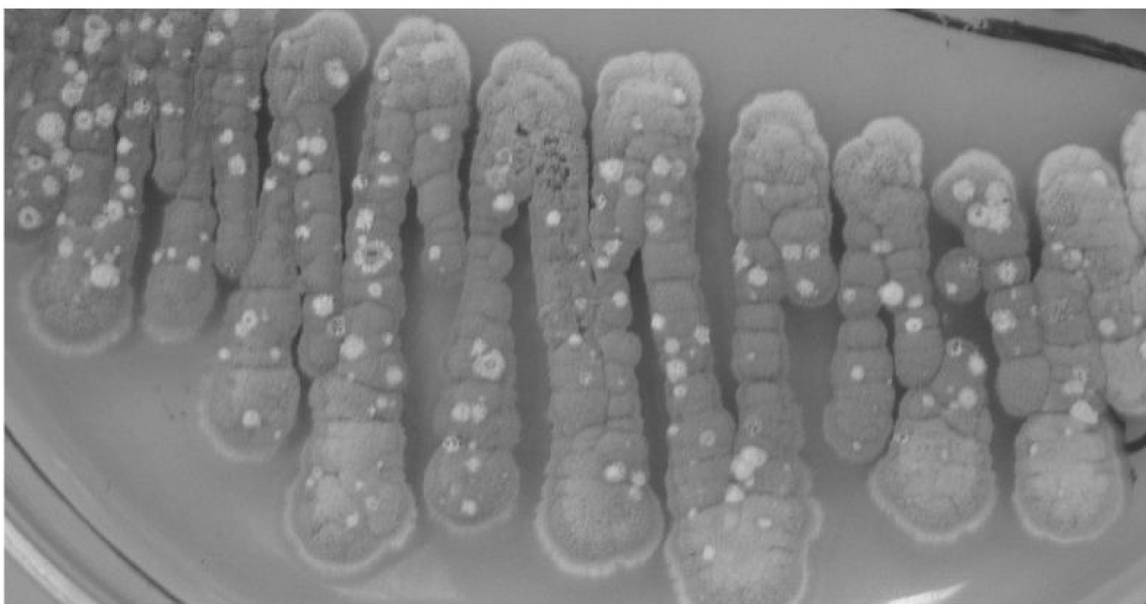


FIGURA 2.27 Aspecto macroscópico do crescimento de actinobactérias em meio quimicamente complexo. (Fonte: próprio autor, Laboratório de Biotecnologia de Actinomicetos)

Essa massa é formada a partir do desenvolvimento inicial de esporos ou fragmentos de hifas em meio sólido, formando primeiramente o micélio vegetativo, de caráter hidrofílico, também chamado micélio substrato ou ainda micélio submerso. Crescendo verticalmente, algumas estirpes de actinobactérias diferenciam seu micélio vegetativo em micélio aéreo, de caráter hidrofóbico, o qual possui características morfológicas e fisiológicas distintas do micélio vegetativo que lhe deu origem (Ensign, 1978) (Figura 2.28). A produção de pigmentos de cores as mais variadas, tanto nos esporos como difundidos no meio, é uma característica do gênero e é utilizada como auxiliar na taxonomia (Figura 2.29).

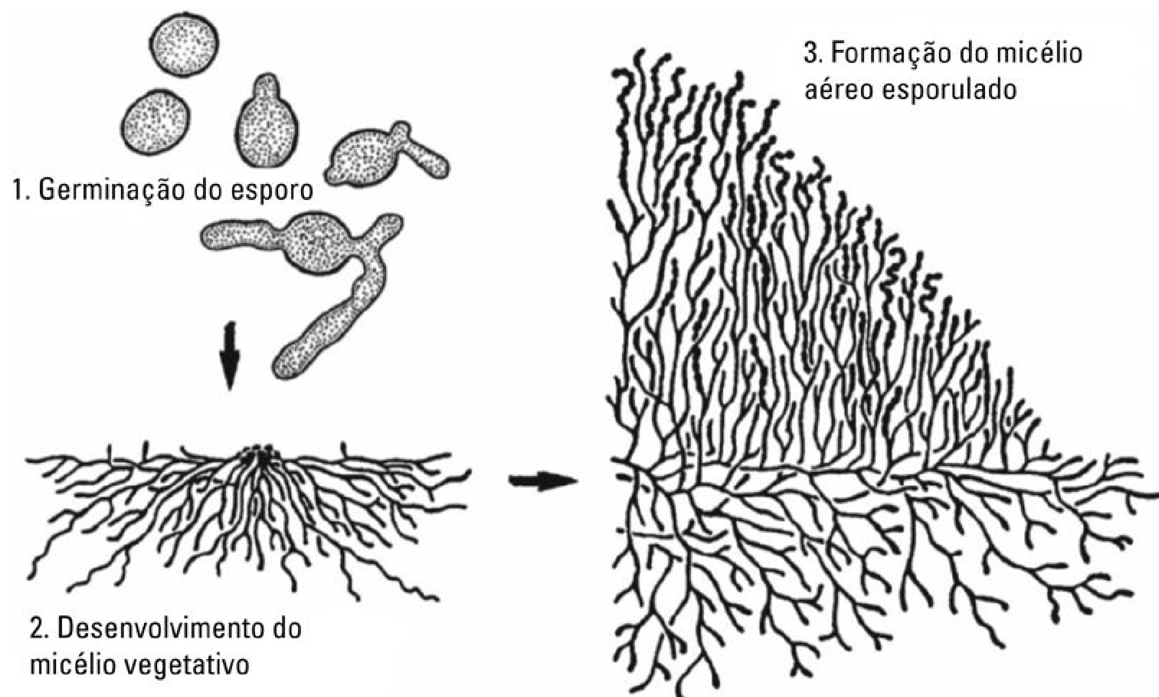


FIGURA 2.28 Esquema demonstrando o desenvolvimento miceliar das actinobactérias a partir da germinação do esporo.
Fonte: Vobis *et al.* (1997).

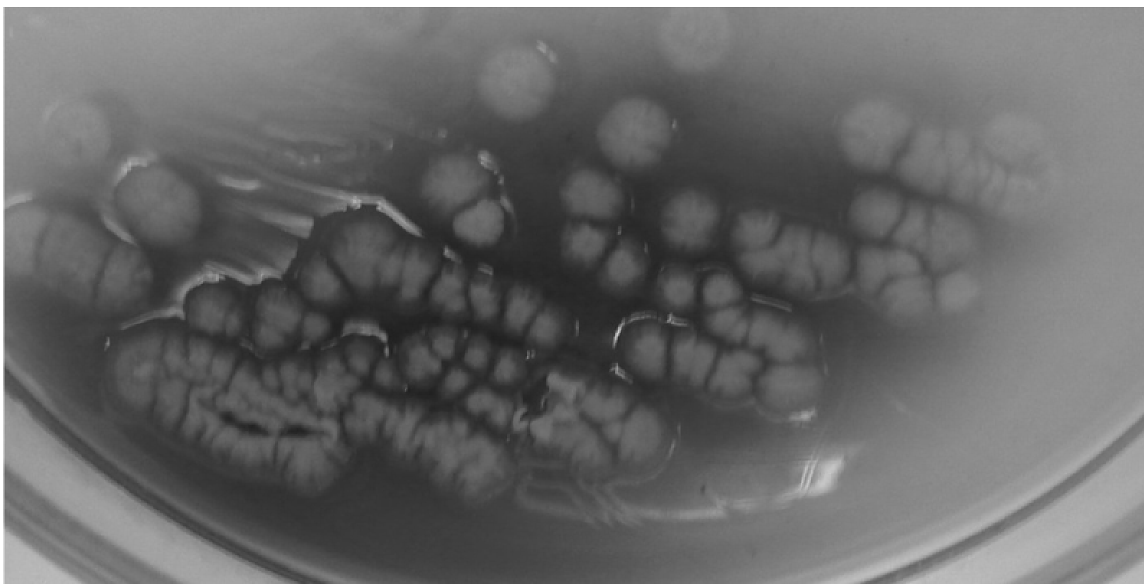


FIGURA 2.29 Produção de pigmento carotenoide difusível no meio de cultivo por actinobactérias. (Fonte: próprio autor, Laboratório de Biotecnologia de Actinomicetos)

Os esporos das actinobactérias se originam normalmente na hifa, onde se desenvolvem a partir da septação e fragmentação da mesma, sendo produzidos individualmente ou em cadeia de 2 ou mais de 50 (característico dos estreptomicetos), e em alguns casos em vesículas de esporo (Cross, 1970). A diversidade das estruturas que contém os esporos, chamados esporóforos, é bastante variada, assim como também os tipos de esporos onde se pode observar variação na forma e superfície, o que também é utilizado como auxiliar na taxonomia.

2.8.3. Reprodução e nutrição

O ciclo de vida das actinobactérias do gênero *Streptomyces*, um dos mais comumente isolados e estudados, pode ser resumido de acordo com a Figura 2.30. Um esporo, ou fragmento de hifa, dá origem ao micélio vegetativo, a partir do qual se desenvolve o micélio aéreo, que pode ou não espiralar, e produz os septos. Ocorre então o espessamento da parede celular e os compartimentos dos esporos ficam então definidos. Os esporos imaturos se tornam arredondados e, em seguida amadurecem, podendo então ser liberados reiniciando o ciclo. As cadeias de esporos de actinobactérias apresentam diferentes arranjos, como observado na Figura 2.31.

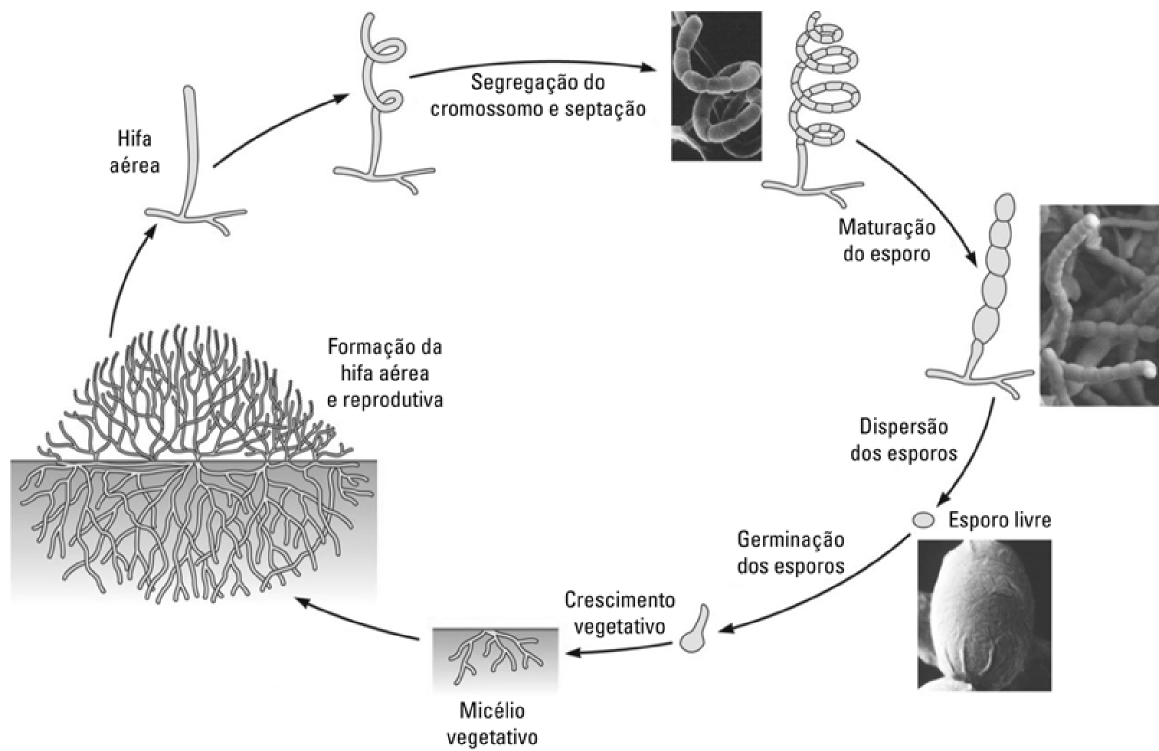


FIGURA 2.30 **Ciclo reprodutivo das actinobactérias.**

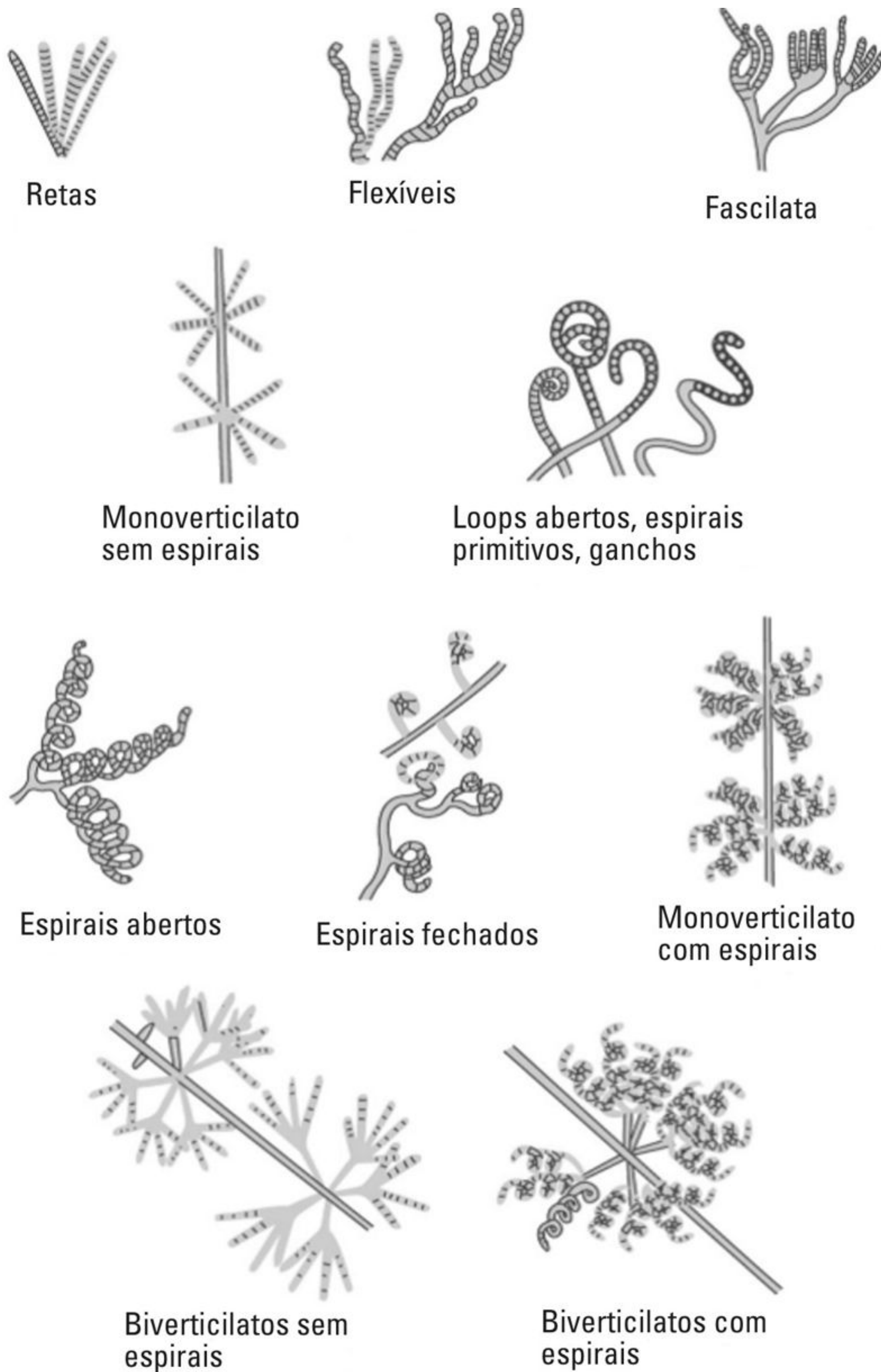


FIGURA 2.31 Arranjo estrutural das diferentes formas de cadeias de esporos das actinobactérias. *Fonte*: Anandan *et al.* (2016).

As actinobactérias são seres quimioheterotróficos, utilizam fonte de N orgânica ou inorgânica e crescem bem sem adição de extratos complexos ou vitaminas. Como já mencionado, são excelentes produtores de substâncias antimicrobianas, sob condições controladas, em laboratório, e existe uma dúvida se nos ambientes naturais essa produção também ocorreria, nesse caso como um processo de proteção e sobrevivência (Williams, 1982).

São também grande produtores de enzimas, principalmente enzimas degradadoras de polímeros complexos naturais, sendo ativos, juntamente com os fungos, nos estágios finais da decomposição de resíduos vegetais e animais mais recalcitrantes. Isso ocorre porque são capazes de produzir enzimas degradadoras de celulose, hemicelulose, lignina, amido, proteína, incluindo queratina, quitina e pectina, entre outras. Além disso, são também capazes de degradar algodão, lã, hidrocarbonetos, borracha e plásticos (Kampfer, 2012).

Uma característica interessante é a capacidade de alguns gêneros realizarem a fixação biológica do nitrogênio. O gênero *Frankia*, por exemplo, é uma actinobactéria endofítica, que fixa nitrogênio em árvores de grande porte, como *Alnus*, casuarina e carvalho (Normand e Benson, 2012).

2.8.4. Ecologia

Através de estudos de microscopia eletrônica foi verificado que os estreptomicetos se encontram nos ambientes naturais principalmente na forma de esporos e permanecem nesse estado por longos períodos (Ensign, 1978; Mayfield *et al.*, 1972). Estes esporos têm como principal função a reprodução, porém é sabido que, apesar de não possuírem as características de resistência dos endósporos bacterianos, possuem, assim como os esporos de fungos, uma resistência a condições adversas um pouco maior do que a das células vegetativas correspondentes. Nos ambientes naturais a disponibilidade de nutrientes não é comum, portanto a maioria dos micro-organismos vive em condição de estarvação, e nessa situação os esporos das actinobactérias conseguem se manter numa forma inativa.

No solo, por exemplo, com o surgimento de um substrato (pode ser uma raiz, um fruto, uma folha, um galho seco, um inseto ou outro animal), se inicia um processo de colonização, que começa com a germinação do esporo e consequente formação do micélio, que dessa maneira se espalha abundantemente pelo substrato. Quando ocorre a exaustão dos nutrientes

provenientes do substrato inicial, ou quando há uma mudança nas condições físicas, tal como mudança no grau de oxigenação, mudança no teor de umidade, ou de pH, volta a ocorrer a esporulação. Apesar das actinobactérias terem como vantagem esporular e sobreviver por longos períodos em uma forma dormente, uma desvantagem é a sua baixa eficiência de germinação (Lloyd, 1969).

2.8.4.1. Habitat

As actinobactérias são amplamente distribuídas em ambientes aquáticos e terrestres, incluindo ambientes extremos tais como sedimentos de águas profundas (Pathom-aree *et al.*, 2006) e desertos hiperáridos (Okoro *et al.*, 2009). Porém o principal reservatório das actinobactérias, em especial as do gênero *Streptomyces*, é o solo, assim como também os sedimentos. Elas têm sido encontradas em todos os tipos de solo, compreendendo de 1-20% da contagem de viáveis totais, ou seja, 10^4 a 10^7 U.F.C. por grama de solo (Kieser *et al.*, 2000). São particularmente comuns em solos onde há papel preponderante na reclicagem da matéria orgânica e de moléculas recalcitrantes (Goodfellow e Williams, 1983).

A presença de actinobactérias em ambientes aquáticos tem sido documentada há bastante tempo. É sugerido, porém, que a maioria dos organismos isolados, tanto de rios e lagos como de seus sedimentos, não sejam nativos destes ambientes, ou seja, devem ter sido carreados para lá a partir dos ambientes terrestres ao seu redor. Portanto, supõe-se que lá não vivam naturalmente, e sim permaneçam numa forma inativa. Já foram encontrados em rios e lagos, porém em baixos números, espécies dos gêneros *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Actinoplanes*, *Nocardia*, *Rhodococcus* e *Thermomonospora* (Cross, 1981).

Vale ressaltar ainda que a água potável também pode ser contaminada com compostos voláteis (álcoois terciários) produzidos principalmente pelo gênero *Streptomyces*, os chamados geosmina e metil-isoborneol (Figura 2.32). Esses dois metabólitos secundários, produzidos durante a fase estacionária de crescimento, são bastante conhecidos, por conferirem aos solos ricos em actinobactérias o chamado cheiro de "**terra molhada**", bastante comum após as chuvas. Estas substâncias são carreadas para os rios a partir do crescimento das actinobactérias em material vegetal em decomposição nas margens dos rios ou lagos, quando o nível das águas sobe, causando contaminação da água com possíveis alterações no gosto e no odor, levando a uma grande insatisfação do consumidor em todo o mundo. (Gerber, 1979; Asquit *et al.*, 2013).

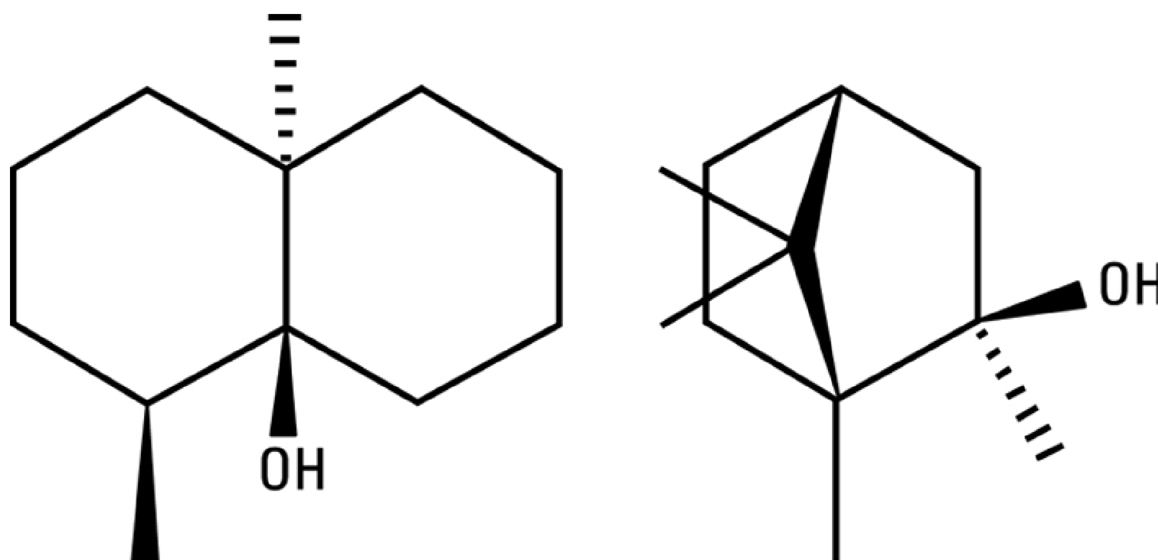


FIGURA 2.32 Estrutura molecular dos compostos aromáticos produzidos por estreptomicetos. *Fonte*: Asquit *et al*. (2013).

A ocorrência de actinobactérias em mares e sedimentos marinhos tem sido observada por vários autores, não apenas na zona superficial, como também em águas profundas, e não apenas perto do litoral, como também em mar aberto. Da superfície total do mar, apenas 8% pode ser considerado área costeira e o restante, mar profundo, do qual 60% apresenta profundidade maior que 2.000 m. O mar profundo é um ambiente único e extremo, caracterizado por alta pressão atmosférica (podendo chegar a 1.000 atm), baixa temperatura, falta de luz, salinidade e concentração de oxigênio variável e de pouco conhecimento científico sobre a diversidade microbiana. Estudos recentes vêm demonstrando que esse ambiente pode ser um excelente "hotspot" no fornecimento de novos microrganismos produtores de novos antibióticos, como descrito na Tabela 2.1 (Subramani e Aalbersberg, 2012). Cerca de 50 gêneros de actinobactérias já foram descritos até 2010 (Goodfellow e Fiedler, 2010). Também sugere-se que os mesmos não sejam autóctones, ou seja, nativos, mas tenham sido carreados a partir dos ambientes terrestres. Entre os gêneros encontrados pode-se citar *Streptomyces* (Pathom-aree *et al.*, 2006), *Dietzia* e *Rhodococcus* (Subramani e Aalbersberg, 2012), *Micromonospora, Rhodococcus* (Goodfellow e Haynes, 1984), *Microbispora* e *Nocardia* (Williams *et al.*, 1984), *Prauserella* (Kim e Goodfellow, 1999) e *Aeromicrobium* (Bruns *et al.*, 2003). Mais recentemente, devido à possibilidade de descoberta de novos metabólitos de interesse comercial, houve um crescente interesse por actinobactérias marinhas, e novos gêneros foram descobertos, como, por exemplo, *Salinospora* (Maldonado

et al., 2005), *Marinispora* (Kwon *et al.,* 2006), *Salinibacterium* (Han *et al.,* 2003), *Serinicoccus* (Xiao *et al.,* 2011), *Verrucosispora* (Riedlinger *et al.,* 2004), *Lamerjespora* (Fortman *et al.,* 2005), *Marinospora* (Kwon *et al.,* 2006) e *Marinactinospora* (Tian *et al.,* 2009). Outros ambientes como florestas de manguezais (Hong *et al.,* 2009), esponjas marinhas (Kim *et al.,* 2005) e pepinos do mar (Kurahashi *et al.,* 2010) também tem sido descritos como habitats de actinobactérias.

Tabela 2.1

Relação de alguns metabólitos com ação antimicrobiana produzidos por actinobactérias marinhas no período de 2005 a 2010

Compostos	**Fonte microbiana**	**Atividade biológica**
Lajolamicina	*Streptomyces nodosus*	Antibacteriana
Marinomicinas A - D	*Marinispora*	Antitumoral, Antibacteriana
Cabomaxina	*Streptomyces*	Antitumoral, Antibacteriana
Tirandamicina	*Streptomyces*	Antibacteriana
Bisantraquinona	*Streptomyces*	Antibacteriana
Proximicinas	*Verrucosispora*	Antitumoral, Antibacteriana

Fonte: Adaptado de Subramani e Aalbersberg (2012).

Nos ambientes marinhos, as actinobactérias desempenham um importante papel para além da produção de diferentes antibióticos. Elas são consideradas as principais bactérias envolvidas na decomposição de compostos orgânicos e sua reciclagem no ambiente marinho profundo. Já foram detectadas linhagens de actinobactérias marinhas capazes de degradar celulose, quitina e proteínas em geral, ressaltando o potencial biotecnológico dos ambientes marinhos (Subramani e Aalbersberg, 2012).

As actinobactérias também são encontradas na atmosfera, tanto em ambientes abertos quanto fechados, porém de uma forma temporária, devido aos ventos ou deslocamentos de ar. A presença delas nestes casos pode causar certas patologias, como diversos tipos de alergias respiratórias (Schall e Beaman, 1984).

Além de solos, sedimentos, águas e atmosfera, também se pode encontrar actinobactérias no estrume de gado e composto de lixo, principalmente nas formas termofílicas (por exemplo, *Thermomonospora* e *Pseudonocardia*), mas também nas mesofílicas (*Rhodococcus*). E ainda em lodo ativado (por exemplo, *Rhodococcus, Microbacterium* e *Corynebacterium* e *Nocardia*), esgoto municipal (por exemplo, *Corynebacterium, Microbacterium*

e *Arthrobacter*) e forragens e grãos estocados em silos (*Streptomyces* e *Micropolyspora*) (Williams *et al.*, 1984).

Alguns estreptomicetos são habitantes do trato gastrointestinal de minhocas (Parle, 1963) ou intestino de artrópodes (Bignell, 1984) enquanto o gênero *Micromonospora* foi descrito como simbiontes de cupins (Williams *et al.*, 1984).

2.8.4.2. Patogenicidade

As actinobactérias podem, dependendo do gênero, causar doenças tanto em seres humanos como em animais e plantas. Nos seres humanos os casos mais amplamente conhecidos são da tuberculose (pulmonar ou ganglionar) e da hanseníase, doenças causadas pelo *Mycobacterium tuberculosis* e o *M. leprae*, respectivamente. Outras espécies desse gênero, assim como outras espécies de outros gêneros, são seres oportunistas, capazes de causar doenças em pacientes imunodeprimidos, como aqueles com câncer, AIDS ou transplantados. Ainda como exemplo de doenças em humanos pode-se citar a nocardiose (pulmonar, sistêmica ou cutânea) causada pelo gênero *Nocardia*, e o actinomicetoma, uma doença crônica destrutiva e progressiva da pele e tecido subcutâneo causada pelo gênero *Actinomadura* (Schaal e Beaman, 1984), mas também por outros gêneros como *Nocardia* (Trujillo e Goodfellow, 2003). Normalmente o gênero *Streptomyces* não causa doenças, mas é descrito como exceção a espécie *Streptomyces somaliensis*, que também causa actinomicetoma (Develoux *et al.*, 1999; McNeil e Brown, 1994). Além disso, infecções oculares e periodontais têm sido relatadas, muitas vezes causadas por membros do gênero *Actinomyces* (Schaal e Beaman, 1984)

Conforme já mencionado, esporos de actinobactérias que se dispersam no ar podem causar doenças alérgicas respiratórias. Isso acontece principalmente em ambientes acima de substratos secos, com superfícies hidrofóbicas, onde os esporos são facilmente espalhados devido a um movimento do ar ou do próprio substrato. É o caso de grãos e feno em silos. O exemplo mais característico é a doença do feno “farmer lung desease”, que pode ser causada por espécies de *Micropolyspora* e *Saccharopolyspora*, entre outros (Williams *et al.*, 1984).

No caso de doenças em animais, é relatado que o gênero *Actinomyces* é considerado o principal causador de infecções em bovinos (Schaal e Beaman, 1984), mas outras espécies, como por exemplo dos gêneros *Actinomadura*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Propionibacterium* e *Tropheryma* também podem ser patogênicas para outros animais (Goodfelow, 2012).

Doenças em vegetais são raras, mas o caso mais conhecido é a doença da batata, causada por *S. scabies* (Lambert e Loria, 1989), que ataca os tubérculos e é dependente de pH neutro a alcalino, sendo mais comum em solos secos. Sugere-se que em condições de alta umidade o *S. scabies* não se desenvolve devido ao crescimento aumentado de bactérias competidoras ou antagonistas (Adam e Lapwood, 1978). Para conter a doença os agricultores se aproveitam dessa característica e irrigam o solo durante três semanas após a iniciação do tubérculo, diminuindo assim, significantemente, a incidência da doença (Lapwood *et al.*, 1970). Outros gêneros como *Clavibacter*, *Curtobacterium* e *Rhodococcus* também infectam plantas (Goodfellow, 2012).

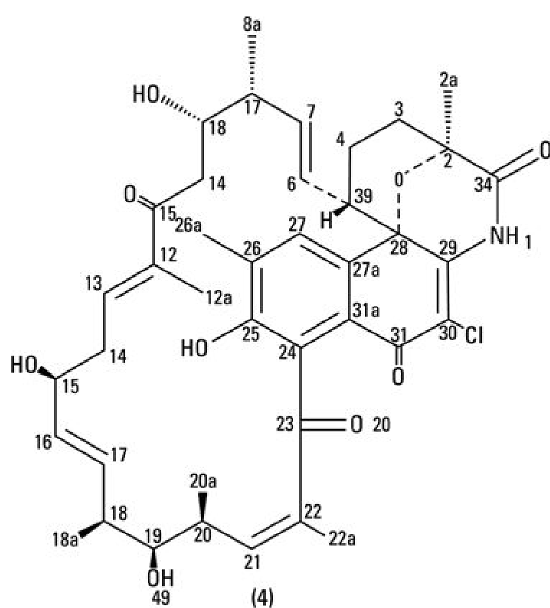
2.8.5. Importância industrial e ambiental

2.8.5.1. Produção de compostos bioativos

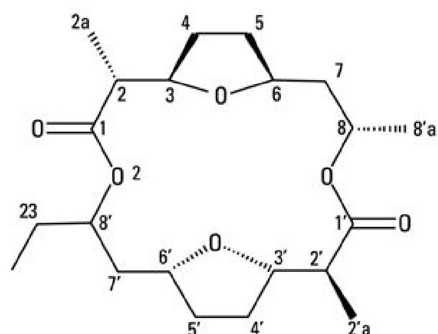
As actinobactérias filamentosas compreendem cerca de 45% de todos os metabólitos secundários microbianos bioativos conhecidos, dos quais 80% (cerca de 6.000) são produzidos pelos representantes do gênero *Streptomyces* (Bérdy, 2005). Apesar disso, estima-se que apenas 10% do total de produtos naturais que poderiam ser sintetizados por esses microrganismos já foram descobertos (Watve *et al.*, 2001). Além desses, gêneros como *Amycolatopsis, Actinomadura* e *Micromonospora*, entre outros, também têm sido fonte de antibióticos de importância clínica (Goodfellow *et al.*, 1984), e gêneros menos conhecidos, descobertos mais recentemente, como *Salinospora* isolado de ambiente marinho, se mostraram promissores nesse quesito (Goodfellow e Fiedler, 2010). Na verdade, atualmente, a corrida para a descoberta de novos metabólitos de importância médica e/ou ambiental tem sido direcionada para a procura de novas espécies de actinobactérias em ambientes extremos ou pouco explorados, tais como ambientes marinhos, desertos hiperáridos, solos da Antártica, e outros biomas pouco estudados (ver item 2.8.3.1). Maiores detalhes sobre a produção de antibióticos podem ser encontrados no Capítulo 11.

O surgimento de bactérias patogênicas com resistência a diferentes antibióticos, o surgimento de novas doenças virais sem um tratamento eficaz, como H1N1, SARS, ZIKA, têm estimulado fortemente a busca por novos compostos biologicamente ativos para a constituição de novos medicamentos, como observado na Figura 2.33 (Qin *et al.*, 2011). Desde os anos quarenta, quando Waksman e colaboradores descreveram a primeira substância antibiótica (actinomicina D) produzida por um *Streptomyces*, e logo em seguida Schatz e colaboradores descreveram a estreptomicina, o

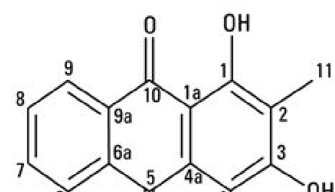
número de antibióticos produzidos por actinobactérias descritos na literatura foi aumentando vertiginosamente, chegando a valores que ultrapassam os milhares (E 2.000). Alguns destes antibióticos estão descritos na Tabela 2.2. Dentre os diversos grupos de substâncias químicas biologicamente ativas, além dos antibióticos antibacterianos, outros compostos com aplicações biotecnológicas como antivirais, antitumorais, agentes imunomoduladores, antifúngicos, herbicidas, inseticidas, acaricidas, antihelmínticos e inibidores de enzimas têm sido descobertos (Bérdy, 2005).

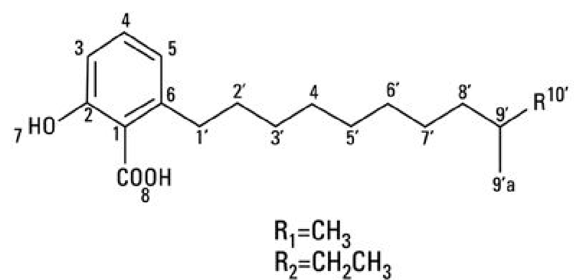


A. Naftomicina K

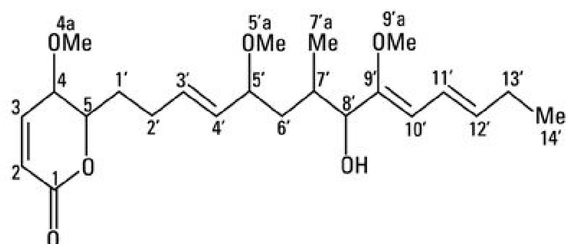


B. Dinactina dimérica

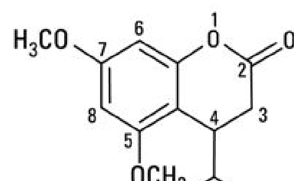




D. Salaceiinas A (1) e B (2)



E. Pterocidina



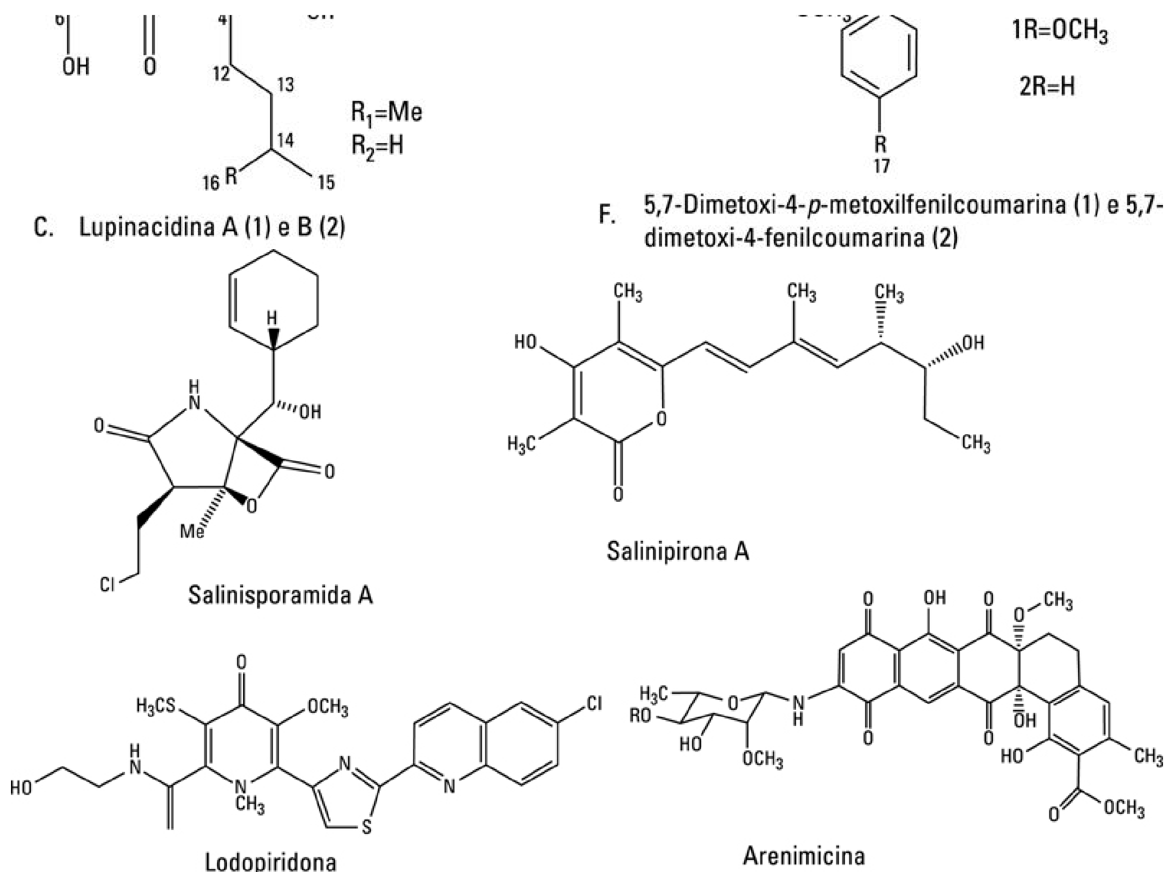


FIGURA 2.33 Estrutura quimíca de alguns compostos bioativos produzidos por actinobactérias endofíticas de plantas (A – F) e de sendimentos marinhos (G – J). *Fonte*: Qin *et al.* (2011) e Subramani e Aalbersberg (2012).

Tabela 2.2

Relação de compostos bioativos com ação antimicrobiana, antitumoral e anti-inflamatória produzidos por actinobactérias

Compostos	**Fonte microbiana**	**Atividade biológica**
Munumbicinas A-D	*Streptomyces* sp. NRRL30562	Antibiótico
Kakadumicinas	*Streptomyces* sp. NRRL30566	Antibiótico
Coronamicinas	*Streptomyces* sp. MSU-2110	Antibiótico
Actinorodina	*Streptomyces coelicolor*	Antibiótico
Cloranfenicol	*Streptomyces coelicolor*	Antibiótico
Lajolamicina	*Streptomyces nodosus*	Antibiótico
Estreptomicina	*Streptomyces griseus*	Antibiótico
Eritromicina	*Streptomyces erythraea*	Antibiótico
Oligomicina	*Streptomyces avermitilis*	Antibiótico
Tirandamicina	*Streptomyces*	Antibiótico
Bisantraquinona	*Streptomyces*	Antibiótico
Antimicina A18	*Streptomyces albidoflavus*	Antifúngico
6-Prenilindole	*Streptomyces* sp. TP-A0595	Antifúngico
Cedarmicinas A e B	*Streptomyces* sp. TP-A0456	Antifúngico
2,4-dimetil-bafilomicina C1 / A2	*Streptomyces* sp. CS	Antitumoral
Cabomaxina	*Streptomyces*	Antitumoral
Lodopiridona	*Saccharomonospora*	Antitumoral
Lupinacidinas A e B	*Micronomospora lupini*	Antitumoral
Naftomicina K	*Streptomyces* sp. CS	Antitumoral
Pterocidina	*Streptomyces hygroscopicus TP-A0451*	Antitumoral
Lansai B e C	*Streptomyces* sp. SUC1	Antinflamatório

Fonte: Adaptado de Qin *et al.* (2011); Subramani e Aalbersberg (2012) e Ochi e Hosaka (2013).

Como já ressaltado, devido a sua grande diversidade metabólica, as actinobactérias do gênero *Streptomyces* vêm sendo descritas como as principais produtoras de antibióticos advindas do solo e por isso são consideradas um dos mais importantes micro-organismos do ponto de vista industrial. Assim sendo, tem sido o grupo de actinobactérias mais comumente isolado e amplamente estudado. Consequentemente, os estudos que envolvem a análise dos genomas deste gênero são de grande importância. Um estudo desse tipo levou à descoberta de 23 conjuntos de genes que codificam para a produção de antibióticos no cromossoma da

espécie *Streptomyces coelicolor* A3(2), e no caso da espécie *Streptomyces avermitilis* MA-4680T foram descobertos 30 genes (Ventura *et al.*, 2007).

2.8.5.2. Produção de enzimas

Após os antibióticos, as enzimas são os compostos mais importantes produzidos pelas actinobactérias. A vantagem da utilização de micro-organismos, incluindo as actinobactérias, na produção de enzimas em substituição às tradicionais fontes animais e vegetais, diz respeito ao rendimento relativamente alto, eficiência de custos e susceptibilidade à manipulação genética. Esses micro-organismos são capazes de produzir enzimas de interesse médico, como as asparaginases e proteases; comercial, como amilases (Figura 2.34), celulases (Figura 2.35) e queratinases; e ambiental, como as lipases, quitinases e lignina peroxidases.

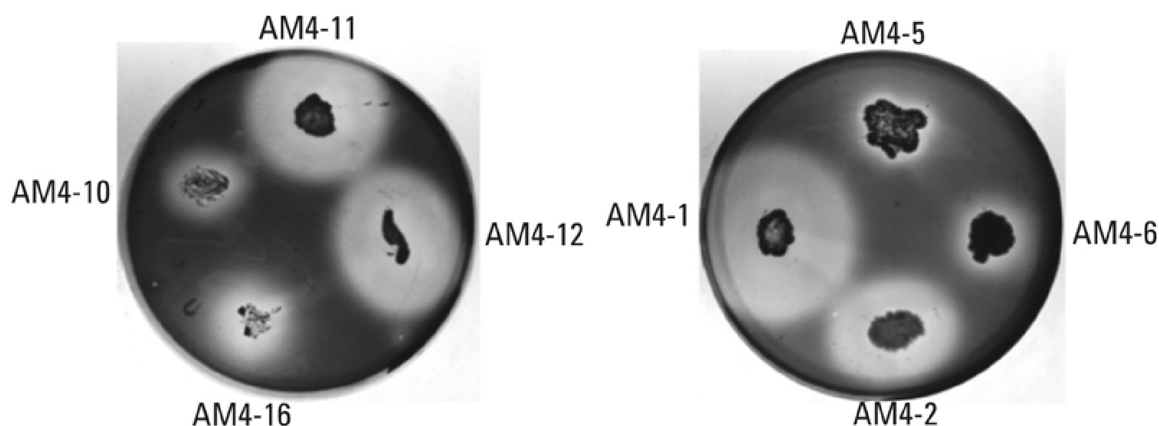


FIGURA 2.34 Detecção das zonas de hidrólise de amido (produção de amilase) em Placa de Petri, após adição de solução de lugol (iodo), por isolados de actinobactérias de ambiente costeiro. (Fonte: próprio autor, Laboratório de Biotecnologia de Actinomicetos)

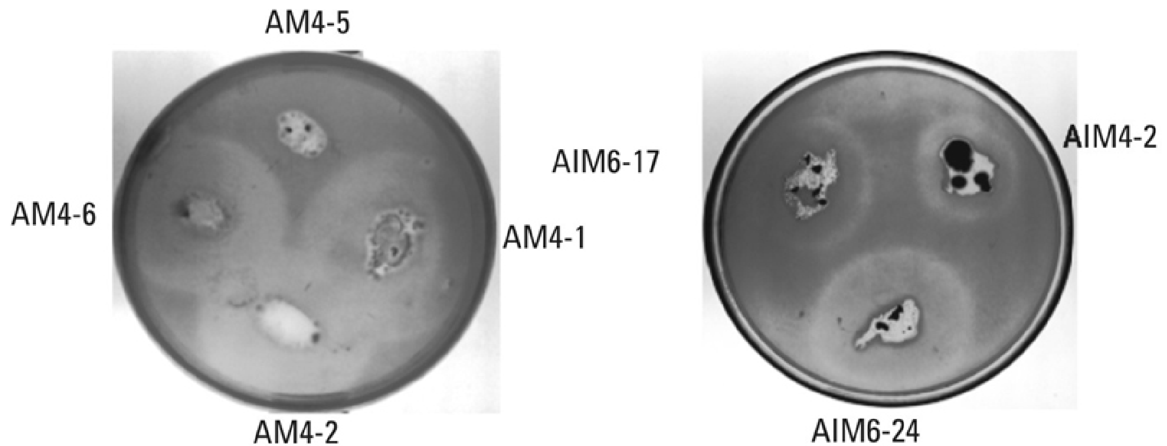


FIGURA 2.35 Detecção das zonas de hidrólise de celulose (produção de celulase) em Placa de Petri, após adição de solução Vermelho Congo (0,1%) por 10 minutos e lavagem com solução NaCl 1M, por isolados de actinobactérias de ambiente costeiro. (Fonte: próprio autor, Laboratório de Biotecnologia de Actinomicetos)

Peczynska-Czoch e Mordarski (1988) fizeram um levantamento acerca das principais enzimas produzidas por actinobactérias descritas na literatura, e que poderiam ser consideradas promissoras para produção em escala industrial. Foram capazes de citar em torno de 35 tipos diferentes, incluindo várias oxidoredutases, transferases, hidrolases, liases, isomerases e sintases, com utilidade nas indústrias farmacêutica, alimentícia, têxtil, de detergentes, na biologia molecular, no tratamento de efluentes, na preservação ambiental, na recuperação de áreas degradadas e no controle biológico.

Os estudos referentes à utilização de actinobactérias para a obtenção de enzimas em escala industrial são bem mais recentes que os de antibióticos. No entanto as actinobactérias, por possuírem uma ampla diversidade ecológica e bioquímica, e por possuírem também uma alta capacidade de produção de metabólitos secundários, podem ser consideradas uma excelente fonte para a procura de novas enzimas com novas especificidades. Na verdade já existem no mercado alguns produtos à base de enzimas produzidos por estes micro-organismos, como é o caso do "Mycostop" (Figura 2.36), usado no controle de fungos fitopatogênicos em diversas plantações em várias partes do mundo, que utiliza quitinases, glucanases e proteases, enzimas capazes de degradar a parede celular destes fungos (Coelho e Nascimento, 2008). As quitinases são responsáveis pela degradação da quitina, polímero encontrado em crustáceos, fungos e insetos, e cuja utilização vem sendo sugerida como agente de controle biológico (Figura 2.37), no combate a fungos fitopatogênicos (El-Tarabily *et*

al., 2006). Além disso, as quitinases produzidas por actinobactérias também podem degradar o exoesqueleto de insetos, tornando essas bactérias excelentes ferramentas para o controle biológico de pragas agrícolas. Na indústria da pesca de crustáceos, por exemplo, a aplicação de microrganismos quitinolíticos, como as actinobactérias, pode auxiliar não só no descarte destes resíduos, como também na produção destas enzimas a baixo custo por processos fermentativos (Chang *et al.*, 2003).



FIGURA 2.36 Exemplo de produto biotecnológico de actinobactérias para uso em sistemas agrícolas. *Fonte (acesso em 31/03/2016)*: http://agrobio.hu/termekek/mycostop-biologiai-gombaolo-szer/.

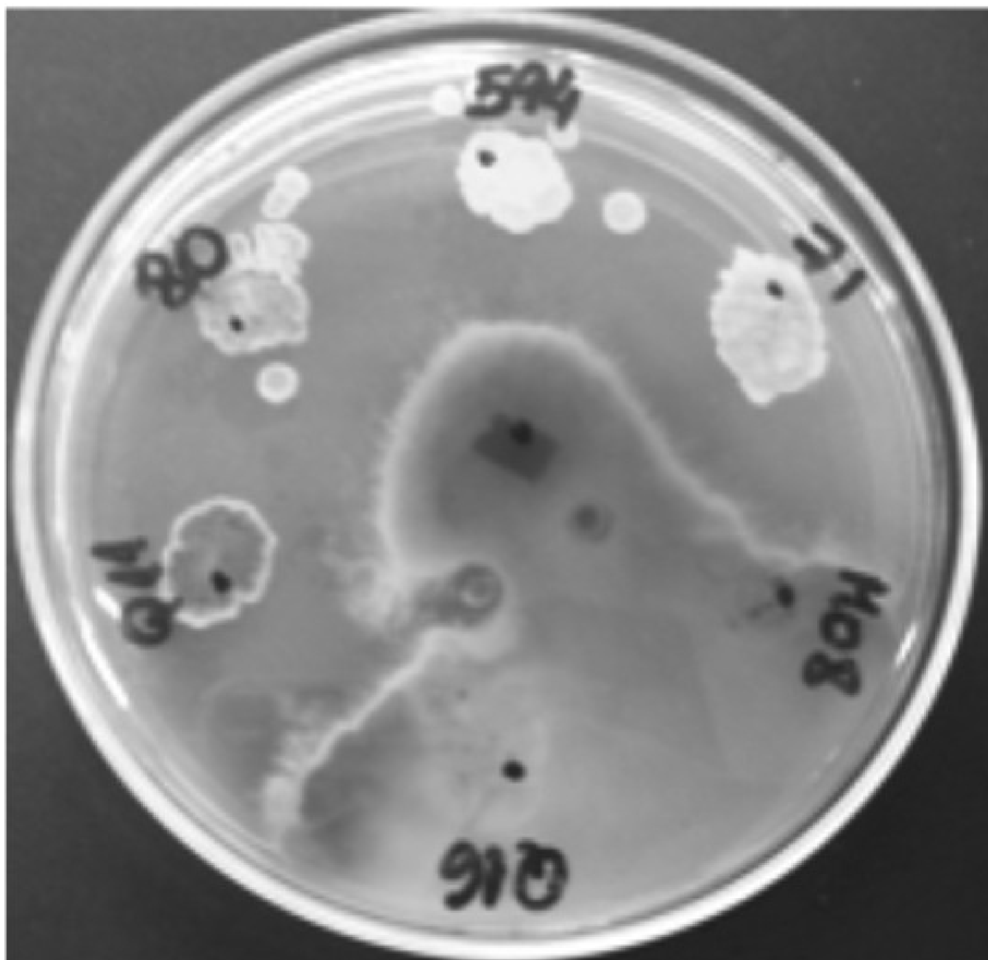


FIGURA 2.37 Avaliação do potencial antagônico de diferentes linhagens de actinobactérias frente ao fungo fitopatógeno *Rhizoctonia solani* (Fonte: próprio autor, Laboratório de Biotecnologia de Actinomicetos)

Como exemplo das diversas aplicações biotecnológicas das enzimas de actinobactérias, podemos citar as celulases e xilanases, que são capazes de degradar a celulose e hemicelulose, respectivamente os polímeros naturais mais abundantes na superfície terrestre, e as ligninas, que são substâncias reconhecidamente resistentes ao ataque da grande maioria de bactérias e fungos. Na indústria papeleira, por exemplo, as xilanases e lignina peroxidases participam de processos de biobranqueamento e as celulases no processo de reciclagem do papel. Na indústria alimentícia, as xilanases são responsáveis pelo clareamento de sucos, e na indústria têxtil as celulases são responsáveis pelo biopolimento e estonagem dos tecidos. No aspecto ambiental estas enzimas também têm papel relevante, como é o caso das lignina peroxidases que auxiliam no tratamento de efluentes da indústria de corantes. Em complemento a isso, nos dias de hoje, o

aproveitamento de resíduos da agroindústria é outro assunto de grande interesse, assim os resíduos vegetais ricos em lignocelulose podem ser aproveitados na produção de enzimas como celulases (Franco-Cirigliano *et al.*, 2013), xilanases (Nascimento *et al.*, 2002) e peptidases (Nascimento *et al.*, 2011).

As actinobactérias também são conhecidas pelo seu elevado potencial em degradar e utilizar, através de enzimas específicas, compostos orgânicos tóxicos presentes no ambiente, como hidrocarbonetos alifáticos, aromáticos (Peczynska-Czoch e Mordarski, 1984) e aromáticos policíclicos (Balachandran *et al.*, 2012), plásticos (Sivan, 2011), derivados de petróleo, e resíduos e efluentes industriais, entre outros. Nestes casos eles se tornam importantes em processos de biorremediação, como é o caso, por exemplo, da biorremediação de petróleo e seus derivados em águas de rios, de mares e em solos. Este processo é realizado por enzimas microbianas, ou mesmo os próprios microrganismos, assim, actinobactérias dos gêneros *Nocardia* (Milić *et al.*, 2009) e *Rhodococcus* (Alvarez *et al.*, 2011), por exemplo, podem participar ativamente. Outro exemplo interessante é a biorremediação de efluentes contendo corantes derivados da indústria têxtil, onde as actinobactérias podem exercer papel importante (Zhou e Zimmermann, 1993). Além disso, esterois como o colesterol, uma variedade de compostos aromáticos (Peczynska-Czoch e Mordarski, 1988), pesticidas (Peczynska-Czoch e Mordarski, 1984), o acetileno (Rosner *et al.*, 1997), o ágar (Chi *et al.*, 2012) e a borracha (Jendrossek *et al.*, 1997) também podem ser degradados. As actinobactérias também podem participar ativamente de transformações de terpenos e alcaloides (Peczynska-Czoch e Mordarski, 1984).

2.8.6. Considerações sobre bactérias e actinobactérias

As bactérias são consideradas os menores organismos existentes no planeta, apresentando uma grande diversidade morfológica e fisiológica. As bactérias podem ser encontradas em diversos habitats no planeta. Sabe-se hoje que o Dominio Bacteria é o maior entre os 3 domínios, em termos de diversidade. Essa diversidade, avaliando em nível metabólico, pode ser de grande relevância industrial e ambiental, pois pode gerar metabólitos de interesse, como ácidos orgânicos (acético, lático, succínico, propiônico), solventes (etanol, acetona, butanol) e outros compostos. O filo das actinobactérias, inserido no Dominio Bacteria, compreendem um grupo de bactérias cuja classificação é bastante complexa, estando sob constante

mudança. Porém, está bem claro que o advento das técnicas moleculares, principalmente aquelas referentes ao sequenciamento de regiões do DNA como a rDNA 16S, tem sido de grande auxílio na taxonomia dos procariotos em geral, tanto para bactérias, como para actinobactérias e arqueias. Sendo um dos principais grupos microbianos produtores de substâncias bioativas, a procura por novas espécies de actinobactérias, com novas atividades metabólicas com vistas a aplicações tecnológicas, se torna de grande interesse.

Várias estratégias têm sido propostas para a procura de espécies bacterianas (actinos e bactérias) novas, entre elas a utilização de meios de cultivo alternativos, maiores períodos de incubação, diferentes temperaturas de incubação, pré-aquecimento do solo e adição de compostos antibacterianos específicos, adição de fontes de carbono mais complexas (hidrocarbonetos poliaromáticos, compostos fenólicos, etc.). A análise de informações fenotípicas para formulação de meios seletivos designados para promover ou restringir o crescimento de determinadas espécies também já foi sugerida. Outra abordagem interessante visa a utilização de novos "habitats", pouco explorados e com características peculiares e únicas. Além disso, através de técnicas moleculares rápidas, gêneros incomuns nos solos podem ser detectados e depois isolados.

Revisão dos conceitos apresentados

- Os procariotos, que estão divididos nos domínios taxonômicos Bacteria e Archaea, são encontrados colonizando os mais variados habitats, incluindo ambientes terrestres, aquáticos e em associação com animais e vegetais.
- A estrutura celular é a unidade fundamental dos procariotos.
- Em geral, as células procarióticas são divididas em 3 compartimentos principais: citoplasma, membrana citoplasmática e parede celular.
- O citoplasma celular, a porção fluida da célula onde está presente, dentre outros componentes, o material genético das células, é limitado pela membrana citoplasmática.
- Com base na estrutura da parede celular, as bactérias são divididas em dois grandes grupos: bactérias Gram-positivas e bactérias Gram-negativas.
- A parede celular de bactérias Gram-positivas é formada principalmente por peptideoglicano; são coradas de roxo na coloração de Gram.

- A parede celular de bactérias Gram-negativas é formada por peptideoglicano e por uma membrana externa; são coradas de rosa na coloração de Gram.
- A peptideoglicana é um polissacarídeo formado por cadeias de unidades repetitivas de N-acetilglicosamina conectadas por ligação glicosídica do tipo β(1-4) ao N-acetil murâmico. As cadeias adjacentes desse polissacarídeo são conectadas através de ligações cruzadas por meio de tetrapeptídeos conectados ao N-acetil murâmico.
- A membrana externa de bactérias Gram-negativas é constituída por por uma camada lipopolissacarídica (camada LPS). Diferentemente da membrana citoplasmática, a membrana externa, além de fosfolipídios, possui polissacarídeos e proteínas.
- A membrana citoplasmática é uma barreira de permeabilidade seletiva da entrada e saída de moléculas do interior celular. Sua principal função é a permeabilidade, transporte e conservação da energia.
- O transporte de substâncias através da membrana citoplasmática pode ser dividido em pelo menos três tipos diferentes: transporte simples, translocação de grupos e sistema ABC.
- Algumas células procarióticas possuem flagelos ancorados na parede celular e na membrana citoplasmática. A rotação dessas estruturas, com energia fornecida pela força próton-motiva, conferem motilidade às células procarióticas.
- Os procariotos podem apresentar diferentes estruturas, como cápsula, camada limosa, *pilli*, fímbrias, inclusões, vesículas de gás, entre outras. Essas estruturas conferem diferentes propriedades às células, como motilidade e armazenamento de energia.
- Endósporos, que são produzidos por diferentes bactérias Gram-positivas, são estruturas resistentes ao calor, desidratação, valores extremos de pH, diferentes agentes químicos, entre outros.
- As células procarióticas podem utilizar duas fontes de energia: a luz (fototróficos) e a energia química (quimiotróficos).
- Procariotos quimiotróficos podem ser divididos em: quimiolitotróficos (utilizam compostos inorgânicos como doadores de elétrons) e quimiorganotróficos (utilizam compostos orgânicos como doadores de elétrons).
- De acordo com a fonte de carbono utilizada na biossíntese celular, os procariotos podem ser classificados como: autotróficos (utilizam o

carbono inorgânico, CO_2, como fonte de carbono) e heterotróficos (utilizam carbono orgânico como fonte de carbono).

- Tanto os procariotos fototróficos como os quimiotróficos armazenam energia, principalmente, em moléculas de adenosina trifosfato (ATP). Em todos os casos essa energia é gerada a partir de reações de óxido-redução.
- A transformação da energia em ATP, através de processos de óxido-redução, envolve a formação de um gradiente de concentração de prótons transmembrana (na cadeia transportadora de elétrons), gerando um potencial elétrico, que é chamado de força próton-motiva.
- O O_2 é utilizado como aceptor final de elétrons na respiração aeróbia, enquanto diferentes compostos, como nitrato, sulfato, entre outros, podem ser utilizados como aceptores finais de elétrons na respiração anaeróbia.
- Em ambientes limitantes de aceptores finais de elétrons alguns microrganismos produzem ATP através da fosforilação ao nível de substrato, ou fermentação, onde o ATP é sintetizado a partir da oxidação parcial dos átomos de carbono de um composto orgânico.
- DNA representa o código genético da célula procariótica. Sua informação é determinada pela sequência de bases nitrogenadas ao longo da cadeia polinucleotídica.
- Os três processos do dogma central da biologia são (1) replicação do DNA, (2) transcrição da informação genética (síntese de RNA) e (3) tradução da informação genética (síntese de proteínas).
- Além do DNA cromossomal, os procariotos podem possuir outros elementos genéticos como plasmídeos (moléculas de DNA que existem separadamente do cromossomo).
- Os procariotos podem realizar a transferência de matérial genético por três mecanismos: transformação (captura de DNA livre no ambiente), transdução (transferência de genes mediada por bacteriófagos) e conjugação (transferência de plasmídeos conjugativos).
- Diferentes processos realizados por procariotos de diferentes filos e grupos taxonômicos podem ser utilizados em aplicações biotecnológicas.
- Bactérias formadoras de endósporos do gênero *Bacillus* e de gêneros correlatos podem ser aplicadas, por exemplo, na agricultura para a promoção do crescimento de plantas e também para a produção de enzimas como quitinase, amilase, celulase e xilanase.

- Bactérias do gênero *Lactobacillus* são as mais utilizadas na área de microbiologia de alimentos e nutrição humana, sendo muitas vezes consideradas como probióticos. Muitas espécies de lactobacilos são essenciais na produção de alimentos fermentados (iogurte, queijo, vinho, cerveja, leite fermentado) e também como fermentos ou conservantes de alimentos.
- As actinobactérias são bactérias Gram-positivas capazes de formar filamentos em alguma fase do seu crescimento.
- As actinobactérias habitam naturalmente solos, sedimentos, ambientes marinhos e também podem estar associadas a plantas e animais.
- Algumas podem causar doenças em seres humanos (*Mycobacterium*, *Nocardia*, *Corynebacterium*, *Actinomyces*) e animais (*Mycobacterium*, *Nocardia*) enquanto outras são capazes de causar doenças em plantas (*Streptomyces scabies*)
- Dentre os gêneros de maior relevância no grupo das actinobactérias, destacamos *Streptomyces* (com mais de 550 espécies descritas), *Nocardia* e *Mycobacterium*.
- As actinobactérias são capazes de produzir vários compostos bioativos, com destaque para os antibióticos e enzimas. Dentre os antibióticos, destacam-se estreptomicina, eritromicina, cloranfenicol, ciclohexamida B (antifúngico). Com relação às enzimas, às celulases, proteases, amilases, quitinases, xilanases e asparaginases são de grande relevância.

Questões

1. Quais as diferenças entre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas?
2. Quais as funções da membrana citoplasmática?
3. Por que a formação dos endósporos nas bactérias não pode ser considerada um modo de reprodução da célula? Quais são as bactérias que conseguem produzir essa estrutura?
4. Sabe-se que os actinomicetos (actinobactérias) são encontrados em abundância nos ambientes terrestres, em especial no solo. Quais as características macro e microscópicas desses micro-organismos?
5. Como as actinobactérias podem ser isoladas do ambiente?
6. Cite 5 aplicações biotecnológicas que justifiquem o estudo dos procariotos como um todo.

7. Qual a relevância industrial de se utilizar bactérias bioluminescentes?
8. Que tipos de ácidos orgânicos podem ser produzidos por bactérias? Justifique.
9. As actinobactérias produzem compostos aromáticos característicos desse grupo. Que compostos são esses e quais os riscos que eles representam para a qualidade da água?
10. Quais os possíveis métodos para transformar geneticamente uma bactéria? Justifique.
11. De que forma as enzimas bacterianas podem ser aplicadas na indústria? Justifique.
12. Por que os lactobacilos são considerados probióticos? Justifique.

Tópicos para discussão

1. O composto Geosmina pode ter aplicabilidade industrial, em especial na indústria de cosméticos?
2. Discuta o papel das bactérias no meio ambiente e como elas podem auxiliar no desenvolvimento de novas tecnologias a favor do homem.

Sugestões para pesquisa

1. Busca de novos compostos bioativos produzidos por actinobactérias. Quais os melhores ambientes para isolar essas bactérias? Desenvolva um trabalho sobre como obter novos compostos bioativos a partir de bactérias.

Referências

Adams MJ, Lapwood DH. Studies on the lenticels development, surface in wet and dry soils. *Annals of Applied Biology*. 1978;90:335–343.

Alvarez VM, Jurelevicius D, Marques JM, Souza PM, Araújo LV, Barros TG, Souza ROMA, Freire DMG, Seldin L. *Bacillus amyloliquefaciens* TSBSO 3.8, a biosurfactant-producing strain with biotechnological potential for microbial enhanced oil recovery. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 2015;136:14–21.

Alvarez, V.M.; Marques, J.M.; Korenblum, E.; Seldin, L. 2011. Comparative Bioremediation of Crude Oil-Amended Tropical Soil Microcosms by Natural Attenuation, Bioaugmentation, or Bioenrichment, Applied and Environmental Soil Science. Volume 2011, Article ID 156320, 10 p. doi:10.1155/2011/156320.

Al-Shorgani NKN, Kalil MS, Yusoff WMW. Fermentation of sago starch to biobutanol in a batch culture using *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564). *Ann Microbiol*. 2012;62:1059–1070.

Anderson SA, Wellington MH. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Inter J Syst Bacteriol*. 2001;51:797–814.

Ash C, Farrow JAE, Wallbanks S, Collins MD. Revealed heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Lett Appl Microbiol*. 1991;13:202–206.

Ash C, Priest FG, Collins MD. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1993;64:253–260.

Asquit EA, Evans CA, Geary PM, Dunstan RH, Cole B. The role of actinobacteria in taste and odour episodes involving geosmin and 2-methylsioborneol in aquatic environments. *Journal of Water Supply: Research and Technology*. 2013;62(7):452–467.

Balachandran C, Duraipandiyan V, Balakrishna K, Ignacimuthu S. Petroleum and polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) degradation and naphthalene metabolism in *Streptomyces* sp. (ERI-CPDA-1) isolated from oil contaminated soil. *Bioresource Technology*. 2012;112:83–90.

Balgir, P.P.; Kaur, B.; Kaur, T.; Daroch, N.; Kaur, G. 2013. In vitro and in survival and colonic adhesion of Pediococcus acidilactici MTCC5101 in human gut. Biomed Res International, vol. 2013, ID 583850.

Banat IM, Franzetti A, Gandolfi I, Bestetti G, Martinotti MG, Fracchia L, Smyth TJ, Marchant R. Microbial biosurfactants production, applications and future potential. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;87(2):427–444.

Benito, Á.G. 2005. Application of molecular techeniques for identification and enumeration of acetic acid bacteria. PhD thesis Universitat Rovira I Virgili.

Bérdy J. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot*. 2005;58:1–26.

Bergey's Manual® of Systematic Bacteriology. 2012. Volume 5. The *Actinobacteria*, Part A and B. Goodfellow, M.; Kämpfer, P.; Busse, H-J.; Trujillo, M.E.; Suzuki, K-I.; Wolfgang, L.; Whitman, W.B. editors. ISBN: 978-0-387-95043-3 (Print) 978-0-387-68233-4 (Online).

Bignell, D.E. 1984. The arthropod gut as an environment for microorganisms. In Invertebrate–Microbial Interactions. Edited by Anderson, Rayner, Walton. UK, Cambridge: Cambridge University Press, p. 205-27.

Blume LR, Noronha EF, Leite J, Queiroz RML, Ricart CAO, Sousa MV, Felix CR. Characterization of *Clostridium thermocellum* Isolates Grown on Cellulose and Sugarcane Bagasse. *Bioenerg Res*. 2013;6:763–775.

Brock TD, Madigan MT, Martinko JM, Parker J. *Microbiologia de Brock*. 12ª ed. Porto Alegre: Artmed; 2010.

Bruns A, Philipp H, Cypionka H, Brinkhoff T. *Aeromicrobium marinum* sp. nov. an abundant pelagic bacterium isolated from the German Wadden sea. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2003;53:1917–1923.

Bull M, Plummer S, Marchesi J, Mahenthiralingam E. The life history of Lactobacillus acidophilus as a probiotic. A tale of revisonary taxonomy, misidentification and commercial success. *FEMS Microbiology Letters*. 2013;349:77–87.

Cai Y, Pang H, Kitahara M, Ohkuma M. *Lactobacillus nasuensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from silage, and emended description of the genus *Lactobacillus*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2012;62:1140–1144.

Castro HF, Williams NH, Ogram A. Phylogeny of sulfate-reducing bacteria. *FEMS Microbiology Ecology*. 2000;31:1–9.

Chang WT, Chen CS, Wang SL. An antifungal chitinase produced by *Bacillus cereus* with shrimp and crab shell powder as a carbon source. *Curr Microbiol*. 2003;47:102–108.

Claus, D.; Berkeley, R.C.W. 1986. *Bacillus* Cohn. 1872. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Sneath PHA ed.). Baltimore: The Williams and Wilkins Co, 2: 1105-39.

Coelho RRR, Nascimento RP. Seleção de actinobactérias produtores de enzimas de interesse biotecnológico. In: Bon EPS, ed. *Enzimas em biotecnologia. Produção, aplicação e mercado*. Rio de Janeiro: Editora Interciência; 2008.

Cross T. The diversity of bacterial spores. *J Applied Bacteriology*. 1970;33:95–102.

Cross T. Aquatic actinomycetes: a critical survey of the occurrence, growth andb role of actinomycetes in aquatic habitats. *J Applied Bacteriology*. 1981;50:397–424.

Develoux M, Dieng MT, Ndiaye B. Mycetoma of the neck and scalp in Dakar. *J Mycol Med*. 1999;9:179–209.

Dicks, L.; Endo, A. 2014. The Family Lactobacillaceae: Genera Other than Lactobacillus. In : Rosenberg, E., Delong, E.F., Lory, S., Stackebrandt, E., Thompson, F., editors. The prokaryotes. 4th ed. Springer.

Du Toit WJ, Lambrechts MG. The enumeration and identification of acetic acid bacteria from South African red wine fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. 2002;74:57–64.

Elo S, Suominen I, Kämpfer P, Juhanoja J, Salkinoja-Salonen M, Haahtela K. *Paenibacillus borealis* sp. nov., a nitrogen fixing species isolated from spruce forest humus in Finland. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51:535–545.

El-Tarabily KA. Rhizosphere-competent isolates of streptomycete and non-streptomycete actinomycetes capable of producing cell-wall-degrading enzymes to control *Pythium aphanidermatum* damping-off disease of cucumber. *Can J Bot*. 2006;84:211–222.

Ensign JC. Formation, properties, and germination of actinomycete spores. *Annu Rev Microbiol*. 1978;32:185–219.

Esivan, M.; Marsilawati, S. 2012. *Prediction of lactic acid concentration using artificial neural network.* Masters thesis, Universiti Teknologi Malaysia. Faculty of Chemical Engineering.

Figueiredo, M.V.B.; Seldin, L.; Araújo, F.F.; Mariano, R.L.R. 2010. Plant Growth Promoting Rhizobacteria: Fundamentals and Applications. In : Maheshwari, D.K., editor. Plant Growth and Health Promoting Bacteria. Series: Microbiology Monographs, v. 18, 21-44.

Fortina MG, Pukall R, Schumann P, Mora D, Parini C, Manachini PL, Stackebrandt E. *Ureibacillus gen. nov.*, a new genus to accommodate *Bacillus thermosphaericus* (Andersson et al. 1995), emendation of *Ureibacillus thermosphaericus* and description of *Ureibacillus terrenus sp. nov*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51:447–455.

Fortman, J.L.; Magarvey, N.A.; Sherman, D.H. 2005. Something old, something new; ongoing studies of marine actinomycetes. Proc SIM 2005.[Abstract S86].

Franco-Cirigliano, M.N.; Rezende, R.C.; Gravina-Oliveira, M.P.; Pereira, P.H.F.; Nascimento, R.P.; Bon, E.P.S.; Macrae, A.; Coelho, R.R.R. 2013. *Streptomyces misionensis* PESB-25 Produces a Thermoacidophilic Endoglucanase Using Sugarcane Bagasse and Corn Steep Liquor as the Sole Organic Substrates BioMed Research International. Volume 2013, Article ID 584207, 9 p. http://dx.doi.org/10.1155/2013/584207.

Gaida SM, Liedtke A, Jentges AH, Engels B, Jennewein S. Metabolic engineering of *Clostridium cellulolyticum* for the production of n-butanol from crystalline cellulose. *Microb Cell Fact*. 2016;15(6):2–11.

Garbeva P, Van Veen JA, Van Elsas JD. Predominant *Bacillus* spp. in Agricultural Soil under Different Management Regimes Detected via PCR-DGGE. *Microb Ecol*. 2003;45:302–316.

Gerber NN. Volatile substances from actinomycetes: their role in the odor pollution of water. *Crit Rev Microbiol*. 1979;9:191–214.

Gittel A, Sorensen KB, Skovhus TL, Ingvorsen K, Schramm A. Prokaryotic community structure and sulfate reducer activity in water from

hightemperature oil reservoirs with and without nitrate treatment. *Applied and Environmental Microbiology*. 2009;75:7086–7096.

Glick BR. Using soil bacteria to facilitate phytoremediation. *Biotechnol Adv*. 2010;28(3):367–374.

Goodfellow M, Williams ST. Ecology of actinomycetes. *Annu Rev Microbiol*. 1983;37:189–216.

Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M. Introduction to and importance of actinomycetes. In: Williams GM, ed. *The Biology of Actinomycetes*. London: Academic Press; 1984:1–6.

Goodfellow M, Haynes JA. Actinomycetes in marine sediments. In: Ortiz-Ortiz BY, ed. *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes*. Orlando: Academic Press; 1984:453–472.

Goodfellow M, O'Donnell AG. Roots of bacterial systematics. In: M. Goodfellow M, O'Donnell AG, eds. *Handbook of New Bacterial Systematics*. London: Academic Press; 1993:3–56.

Goodfellow M, Fiedler HP. A guide to successful bioprospecting: informed by actinobacterial systematics. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2010;98:119–142.

Goodfellow, M. 2012. Class I: Actinobacteria. Stackebrandt, Rainey and Ward-Rainey 1997, 483. In : Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H-J., Trujillo, M.E., Suzuki, K-I., Ludwig, W., William, B., editors. WhitmanBergey's Manual® of Systematic Bacteriology, 2012, v. 5. The *Actinobacteria*, Part A and B. ISBN: 978-0-387-95043-3 (Print) 978-0-387-68233-4 (Online) p. 34-5.

Gordon, R.E.; Haynes, W.C.; Pang, H.N. 1973. The genus *Bacillus*. Agriculure Handbook n. 427. US Department of Agriculture, Washington, DC.

Guillamón, J.M.; Mas, A. 2009. Chapter 2 Acetic Acid Bacteria. In: König, H.; Unden, G.; Fröhlich, J. Biology of microorganisms on grapes, in must and in the wine. Springer-Verlang Berlin Heidelberg.

Gupta R, Gupta N, Rathi P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004;64:763–781.

Gupta R, Bisaria VS, Sharma S. Effect of Agricultural Amendments on *Cajanus cajan* (Pigeon Pea) and Its Rhizospheric Microbial Communities - A Comparison between Chemical Fertilizers and Bioinoculants. *PLoS One*. 2015;10(7):e0132770. doi: 10.1371/journal.pone.0132770.

Hammes WP, Vogel RF. The genus Lactobacillus. In: Wood BJB, Holzapfel WH, eds. *The genera of lactic acid bacteria*. London: Blackie Academic & Professional; 1995:19–54.

Han SK, Nadashkovskaya OI, Mikhailov VV, Kim SB, Bae KS. *Salinibacterium amurskyense* gen. nov., sp. nov., a novel genus of the family Microbacteriaceae from the marine environment. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2003;53:2061–2066.

Heyndrickx M, Lebbe L, Kersters K, De Vos P, Forsyth G, Logan NA. *Virgibacillus*: a new genus to accommodate *Bacillus pantothenticus* (Proom and Knight 1950).

Emended description of Virgibacillus pantothenticus. *Int J Syst Bacteriol*. 1998;48:99–106.

Hong K, Gao AH, Xie QY, Gao H, Zhuang L, Lin HP, Yu HP, Yao XS, Goodfellow M, Ruan JS. Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Mar Drugs*. 2009;7:24–44.

Ismail S, Dadrasnia A. Biotechnological potential of *Bacillus salmalaya* 139SI: a novel strain for remediating water polluted with crude oil waste. *PLoS One*. 2015;10(4):e0120931: doi: 10.1371/journal.pone.0120931. eCollection 2015.

Javaherdashti R. A review of some characteristics of MIC caused by sulfate-reducing bacteria: past, present and future. *Anti-Corrosion Methods and Materials*. 1999;46(3):173–180.

Jendrossek D, Tomasi G, Kroppenstedt RM. Bacterial degradation of natural rubber: a privilege of actinomycetes? *FEMS Microbiol Lett*. 1997;150:179–188.

Jiang J, Liu H, Li Q, Gao N, Yao Y, Xu H. Combined remediation of Cd-phenanthrene co-contaminated soil by *Pleurotus cornucopiae* and *Bacillus thuringiensis* FQ1 and the antioxidant responses in *Pleurotus cornucopiae*. *Ecotoxicol Environ Saf*. 2015;120:386–393: doi: 10.1016/j.ecoenv.2015.06.028. Epub 2015 Jun 24.

Joung KB, Cote JC. Evaluation of ribosomal RNA gene restriction patterns for the classification of *Bacillus* species and related genera. *J Appl Microbio*. 2002;92:97–108.

Kadokura K, Rokutani A, Yamamoto M, Ikegami T, Sugita H, Itoi S, Hakamata W, Oku T, Nishio T. Purification and characterization of Vibrio parahaemolyticus extracellular chitinase and chitin oligosaccharide deacetylase involved in the production of heterodisaccharide from chitin. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2007;75:357–365.

Kampfer P, Kroppenstedt RM, Dott W. A numerical classification of the genera Streptomyces and Streptoverricillium using miniaturized physiological tests. *J Gen Microbiol*. 1991;137:1831–1891.

Kämpfer, P. 2012. Family I. Streptomycetaceae Waksman and Henrici 1943, 339AL emend. Rainey, Ward-Rainey and Stackebrandt 1997, 486 emend. Kim, Lonsdale, Seong and Goodfellow 2003b, 113 emend. Zhi, Li and Stackebrandt 2009, 600. In : Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H-J., Trujillo, M.E., Suzuki, K-I., Ludwig, W., Whitman, W.B., editors. Bergey's Manual®of Systematic Bacteriology, 2nd ed. Volume Five The Actinobacteria, Part A and B. p. 1446-1806.

Kataoka M, Ueda K, Kudo T, Seki T, Yoshida T. Application of the variable region in 16S rDNA to create an index for rapid species identification in the genus *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Lett*. 1997;151:249–255.

Kieser T, Bibb MJ, Buttner MJ, Chater KF, Hopwood DA. *Practical Streptomyces Genetics*. Norwich: The John Innes Foundation; 2000.

Kim SB, Goodfellow M. Reclassification of *Amycolatopsis rugosa* as *Prauserella rugosa* gen. nov., comb. now. *Int J Syst Bacteriol*. 1999;49:507–512.

Kim TK, Garson MJ, Fuerst JA. Marine actinomycetes related to the “Salinispora” group from the Great Barrier Reef sponge Pseudoceratina clavata. *Environ Microbiol*. 2005;7:509–519.

Kim, B.H.; Gadd, G.M. 2008. Bacterial Physiology and Metabolism. Cambridge University Press. ISBN: 978-0-521-84636-3, p. 252-353.

Koeck DE, Koellmeier T, Zverlov VV, Liebl W, Scwartz WH. Differences in biomass degradation between newly isolated environmental strains of *Clostridium thermocellum* and heterogeneity in the size of the cellulosomal scaffoldin. *System Appl Microbiol*. 2015;38:424–432.

Kurahashi M, Tukanaga Y, Sakiyama Y, Harayama S, Yokota A. Iamia majanohamensis gen. nov., sp. nov., an actinobacterium isolated from sea cucumber Holothuria edulis, and proposal of Iamiaceae fam nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009;59:869–873.

Kwon HC, Kauffman CA, Jensen PR, Fenical W. Marinomycins A-D, antitumor antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus Marinispora. *J Am Chem Soc*. 2006;128:1622–1632.

Labeda DP. DNA-DNA hybridization in systematics of *Streptomyces*. *Gene*. 1992;115:249–253.

Lambert DH, Loria R. *Streptomyces scabies* sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Bacteriol*. 1989;39:387–392.

Langham CD, Williams ST, Sneath PHA, Mortimer AM. New probability matices for identification of Streptomyces. *J Gen Microbiol*. 1989;135:121–133.

Lapwood DH, Wellings LW, Rosser WR. The control of common scab of botatoes by irrigation. *Annals of Apllied Biology*. 1970;66:397–405.

Lechevalier MP, Lechevalier H. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int J Syst Bacteriol*. 1970;20:435–443.

Liang YL, Zhang Z, Wu M, Wu Y, Feng JX. Isolation, screening, and identification of cellulolytic bacteria from natural reserves in the subtropical region of China and optimization of cellulase production by *Paenibacillus terrae* ME27-1. *Biomed Res Int*. 2014;2014:512497: doi:10.1155/2014/512497. Epub 2014 Jun 19.

Lloyd AB. Dispersal of *Streptomycetes* in air. *J Gen Microbiol*. 1969;57:35–40.

Locci R, Sharples P. Morphology. In: Goodfellow M, Mordaski M, Willimas ST, eds. *The biology of the actinomycetes*. New York: Academic Press; 1984.

Logan NA, De Vos P. *Endospore-forming Soil Bacteria. London*. New York: Springer Heidelberg Dordrecht; 2011.

Logan NA, De Clerck E, Lebbe L, An Verhelst Goris J, Forsyth G, Rodríguez-Díaz M, Heyndrickx M, De Vos P. *Paenibacillus cineris* sp. nov. and *Paenibacillus cookii* sp. nov., from Antarctic volcanic soils and a gelatin-processing plant. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2004;54:1071–1076.

Lu J, Nogi Y, Takami H. *Oceanobacillus iheyensis* gen. nov., sp. nov., a deep-sea extremely halotolerant and alkaliphilic species isolated from a depth of 1.050 m on the Iheya Ridge. *FEMS Microbiol Lett*. 2001;205:291–297.

Maldonado LA, Fenical W, Jensen PR, Kauffman CA, Mincer TJ, Ward AC, Bull AT, Goodfellow M. *Salinispora arenicola* gen. nov., sp. nov. and *Salinispora tropica* sp. nov., obligate marine actinomycetes belonging to the family Micromonosporaceae. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2005;55:1759–1766.

Maughan H, Van Der Auwera G. *Bacillus* taxonomy in the genomic era finds phenotypes to be essential though often misleading. *Infect Genet Evol*. 2011;11(5):789–797.

Mayfield CI, Williams ST, Ruddick SM, Hatfield HL. Studies of the ecology of actinomycetes in soil IV. Observation in the form and growth of Streptomycetes in soil. *Soil Biol Biochem*. 1972;4:79–91.

Mcdonald D, Price MN, Goodrich J, Nawrocki EP, Desantis TZ, Probst A, Andersen GL, Knight R, Hugenholtz P. An improved Greengenes taxonomy with explicit ranks for ecological and evolutionary analyses of bacteria and archaea. *ISME J*. 2011;6(3):610–618.

Mckinlay JB, Shachar-Hill Y, Zeikus JG, Vieille C. Determining *Actinobacillus succinogenes* metabolic pathways and fluxes by NMR and GC–MS analyses of C-13-labeled metabolic product isotopomers. *Metab Eng*. 2007;9:177–192.

Mcneil MM, Brown JM. The medical important aerobic actinomycetes: epidemiology and microbiology. *Clin Microbiol Rev*. 1994;7:357–417.

Meena S, Gothwal RK, Krishna Mohan M, Ghosh P. Production and purification of a hyperthermostable chitinase from *Brevibacillus formosus* BISR-1 isolated from the Great Indian Desert soils. *Extremophiles*. 2014;18(2):451–462: doi:10.1007/s00792-014-0630-4. Epub 2014 Jan 29.

Milić JS, Beškoski VP, Ilić MV, Ali SAM, Gojgić-Cvijović GDE, Vrvić MM. Bioremediation of soil heavily contaminated with crude oil and its products: composition of the microbial consortium. *J Serb Chem Soc*. 2009;74(4):455–460: Original scientific paper. doi:10.2298/JSC0904455M 455.

Miletto M, Bodelier PLE, Laanbroek HJ. Improved PCR-DGGE for high resolution diversity screening of complex sulfate-reducing prokaryotic communities in soils and sediments. *Journal of Microbiological Methods*. 2007;70:103–111.

Mongkolthanaruk W. Classification of Bacillus Beneficial Substances Related to Plants, Humans and Animals. *J Microbiol Biotechnol*. 2012;22(12):1597–1604.

Muyzer G, Stams AJM. The ecology and biotechnology of sulphate reducing bacteria. *Nature Reviews Microbiology*. 2008;6:441–454.

Nascimento RP, Coelho RRR, Marques S, Alves L, Girio LF, Bon EPS, Amaral-Collaço MT. Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. *Enzyme and Microbial Technology*. 2002;31:549–555.

Nascimento RP, Junior NA, Coelho RRR. Brewer's spent grain and corn steep liquor as alternative culture medium substratesfor proteinase production by *Streptomyces malaysiensis* AMT-3. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011;42:1384–1389.

Nazina TN, Tourova TP, Poltaraus AB, Novikova EV, Grigoryan AA, Ivanova AE, Lysenko AM, Petrunyaka VV, Osipov GA, Belyaev SS, Ivanov MV. Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus gen. nov., sp. nov.* and *Geobacillus uzenensis sp. nov*. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus, Bacillus thermocatenulatus, Bacillus thermoleovorans, Bacillus kaustophilus, Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, G. th. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51:433–446.

Newman DJ, Cragg GM. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J Nat Prod*. 2007;70:461–477.

Normand, P.; Benson, D.R. 2012. Genus I. Frankia Brunchorst 1886, 174AL. In : Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H-J., Trujillo, M.E., Suzuki, K-I., Ludwig, W., Whitman, W.B., editors. Bergey's Manual®of Systematic Bacteriology, 2012, Volume 5, The *Actinobacteria*, Part A and B. p. 512-17.

Ochi K, Hosaka T. New strategies for drug discovery: activation of silent or weekly expressed microbial gene clusters. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;27(1):87–98.

Okino S, Noburyu R, Suda M, Jojima T, Inui M, Yukawa H. An efficient succinic acid production process in a metabolically engineered *Corynebacterium glutamicum* strain. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2008;81:459–464.

Olano C, Mendez C, Salas JA. Antitumor compounds from marine actinomycetes. *Mar Drugs*. 2009;7:210–248.

Oroko CK, Brown R, Jones AL, Andrews BA, Asenjo JA, Goodfellow M, Bull AT. Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama desert, Chile. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 2009;95:121–133.

Parle JN. Microorganisms in the intestines of earth worms. *J Gen Microbiol*. 1963;31:1–11.

Pathom-Aree W, Stach JEM, Ward AC, Horikoshi K, Bull AT, Goodfellow M. Diversity of actinomycetes isolated from Challenger Deep sediment (10,898 m) from the Mariana Trench. *Extremophiles*. 2006;10:181–189.

Peczynska-Czoch W, Mordarski M. Actinomycete enzymes. In: Goodfellow M, Mordaski M, Williams SD, eds. *Actinomycetes in Biotechnology*. London: Academic Press; 1988:219–283.

Peczynska-Czoch W, Mordarski EM. Transformation of xenobiotics. In: Goodfellow M, Mordaski M, Williams SD, eds. *The Biology of Actinomycetes*. London: Academic Press, London; 1984:287–336.

Priest FG. Systematics and Ecology of Bacillus. In: Sonenshein AL, Hoch JA, Losick R, eds. *Bacillus subtilis and other Gram-positive bacteria: biochemistry, physiology and molecular genetics*. Washington, D.C.: American Society for microbiology; 1993.

Qin S, Xing K, Iang JH, Xu LH, Li WJ. Biodiversity, bioactive natural products and biotechnological potential of plant-associated endophytic actinobacteria. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;89:457–473.

Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glöckner FO. The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucl Acids Res*. 2013;41(D1):D590–D596.

Ralph A, Slepecky RA, Hemphill HE. The Genus *Bacillus* – Nonmedical, CHAPTER 1.2.16. *Prokaryotes*. 2006;4:530–562: doi:10.1007/0-387-30744-3_16.

Raspor P, Goranovič D. Biotechnological Applications of Acetic Acid Bacteria. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2008;28:101–124.

Riedlinger J, Reicke A, Krismer B, Zahner H, Bull AT, Maldonado LA, et al. Abyssomicins, inhibitors of para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine Verrucosispora strain AB-18-032. *J Antibiot*. 2004;57:271–279.

Rosario, M. O. H. V. 2014. Isolamento e Identificação molecular de bactérias redutoras de sulfato de amostras de água produzida em campo de petróleo. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA.

Rosner CM, Rainey F, Kroppenstedt R, Schink B. Acetylene degradation by new isolates of aerobic bacteria and comparison of acetylene hydratase enzymes. *FEMS Microbiology Letters*. 1997;148:175–180.

Salvetti E, Torriani S, Feliz GE. The genus *Lactobacillus*: A taxonomic update. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*. 2012;4(4):217–226.

Schaal KP, Beaman BL. Clinical significance of actinomycetes. In: Goodfellow M, Mordaski M, Williams SD, eds. *The biology of the actinomycetes*. New York: Academic Press; 1984.

Schallmey M, Singh A, Ward OP. Developments in the use of Bacillus species for industrial production. *Can J Microbiol*. 2004;50:1–17.

Sembiring L, Ward AC, Goodfellow M. Selective isolation and characterisation of members of the *Streptomyces violaceusniger* clade associated with the roots of *Paraserianthes falcataria*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2000;78:353–366.

Shida O, Takagi H, Kadowaki K, Nakamura LK, Komagata K. Proposal for two new genera, *Brevibacillus* gen. nov. and *Aneurinibacillus* gen. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1996;46:939–946.

Sivan A. New perspectives in plastic biodegradation. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011;22(3):422–426.

Snyder L, Peters JE, Henkin TM, Champness W. *Molecular Genetics of Bacteria*. 4th ed. Washington DC: ASM Press; 2013.

Spring S, Ludwig W, Marquez MC, Ventosa A, Schleifer KH. *Halobacillus* gen. nov., with description of *Halobacillus litoralis* comb. nov. *Int J Syst Bacteriol*. 1996;46:492–496.

Subramani R, Aalbersberg W. Marine actinomycetes: an ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiol Res*. 2012;167:571–580.

Sussman M, Mieog JC, Doyle J, Victor S, Willis BL, Bourne DG. Vibrio Zinc-Metalloprotease Causes Photoinactivation of Coral Endosymbionts and Coral Tissue Lesions. *PLoS ONE*. 2009;4(2):e4511. doi: 10.1371/journal.pone.0004511.

Thomas L, Sindhu R, Binod P, Pandey A. Production of a cellulase-free alkaline xylanase from *Bacillus pumilus* MTCC 5015 by submerged fermentation and its application in biobleaching. *Indian J Exp Biol*. 2015;53(6):356–363.

Thompson FL, Thompson CC, Naser S, Hoste B, Vandemeulebroecke K, Munn C, Bourne D, Swings J. *Photobacterium rosenbergii* sp. nov. and *Enterovibrio coralii* sp. nov., vibrios associated with coral bleaching. *Int J System Evol Microbiol*. 2005;55:913–917.

Tian XP, Tang SK, Dong JD, Zhang YQ, Xu LH, Zhang S, et al. *Marinactinospora thermotolerans* gen. nov., sp. nov., a marine actinomycete isolated from a sediment in the Northern South China Sea. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2009;59:948–952.

Tigunova OA, Shulga SM, Blume YB. Biobutanol as an alternative type of Fuel. *Tsitologiya i Genetika*. 2013;47(6):51–71.

Trujillo ME, Goodfellow M. Numerical phenetic classification of clinically significant aerobic sporoactinomycetes and related organisms. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2003;84:39–68.

Van Elsas JD, Jansson JK, Trevors JT. *Modern Soil Microbiology*. 2nd ed. Boca Raton, London, New York: CRC Press Taylor & Francis Group; 2007.

Wang P, Lu Z, Zhang D. Slippery liquid-infused porous surfaces fabricated on aluminum as a barrier to corrosion induced by sulfate reducing bacteria. *Corrosion Science*. 2015;93:159–166.

Waino M, Tindall BJ, Schumann P, Ingvorsen K. *Gracilibacillus gen. nov.,* with description of *Gracilibacillus halotolerans gen. nov., sp. nov.;* transfer of *Bacillus dipsosauri* to *Gracilibacillus dipsosauri comb. nov.,* and *Bacillus salexigens* to the genus *Salibacillus gen. nov.*, as *Salibacillus salexigens comb. nov*. *Int J Syst Bacteriol*. 1999;49:821–831.

Watve MG, Tickoo R, Jog MM, Bhole BD. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*. *Arch Microbiol*. 2001;176:386–390.

Williams ST. Are antibiotics produced in soil? *Pedobiologia*. 1982;23:427–435.

Williams ST, Lanning S, Wellington EMH. Ecology of actinomycetes. In: Goodfellow M, Mordaski M, Williams SD, eds. *The Biology of Actinomycetes*. London: Academic Press; 1984:481–528.

Williams JG, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res*. 1990;18:6531–6535.

Williams ST, Goodfellow M, Alderson G, Wellington EMH, Sneath PHA, Sackin MJ. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J Gen Microbiol*. 1983;129:1743–1813.

Williams ST, Goodfellow M, Alderson G, Wellington EMH, Sneath PHA, Sackin MJ. A probability matrix for identification of some *Streptomycetes*. *J Gen Microbiol*. 1983;129:1815–1830.

Won-Jae C, Yong-Keun C, Soon-Kwang H. Agar degradation by microorganisms and agar-degrading enzymes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;94:917–930. doi: 10.1007/s00253-012-4023-2.

Xiao J, Luo Y, Xie S, Xu J. *Serinicoccus profundi* sp. nov., a novel actinomycete isolated from deep-sea sediment and emended description of the genus Serinicoccus. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2011;61:16–19.

Yoon JH, Weiss N, Lee KC, Lee IS, Kang KH, Park YH. *Jeotgalibacillus alimentarius* gen. nov., sp. nov., a novel bacterium isolated from jeotgal with L-lysine in the cell wall, and reclassification of *Bacillus marinus* Ruger 1983 as *Marinibacillus marinus* gen. nov., comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2001;51:2087–2093.

Zeikus JG, Jain MK, Elankovan P. Biotechnology of succinic acid productionand markets for derived industrial products. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1999;51(5):545–552.

Zhang C, Yu L, Qian R. Characterization of OmpK, GAPDH and their fusion OmpK–GAPDH derived from *Vibrio harveyi* outer membrane proteins: their immunoprotective ability against vibriosis in large yellow croaker (*Pseudosciaena crocea*). *J Appl Microbiol*. 2007;103(5):1587–1599.

Zhou W, Zimmermann W. Decolorization of industrial effluents containing reactive dyes by actinomycetes. *FEMS Microbiology Letters*. 1993;107:157–161: doi: http://dx.doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb06023.x.

CAPÍTULO

3

Biologia e Biotecnologia de Fungos

Vívian Nicolau Gonçalves

Camila Rodrigues de Carvalho

Soraya Sander Amorim

Graciéle Cunha Alves de Menezes

Gislaine Aparecida Vitoreli

Jéssica Catarine Silva de Assis

Luiz Henrique Rosa

Conceitos apresentados neste capítulo

Neste capítulo será apresentada a biologia básica dos fungos filamentosos, a qual envolve sua hierarquia taxonômica, filos e grupos afins reconhecidos, ciclos reprodutivos, morfologia, diversidade e relações ecológicas com os outros seres vivos. Além disso, este capítulo também irá tratar das aplicações biotecnológicas dos fungos filamentosos quanto à produção de moléculas de interesse nas indústrias farmacêuticas, de alimentos e na agricultura, além do uso em processos de controle da poluição em ambientes naturais.

3.1. Introdução

Os fungos filamentosos representam um grupo microbiano altamente diversificado em termos de morfologia, fisiologia e genética. Virtualmente, os fungos filamentosos estão presentes em todos os ecossistemas do planeta, ocupam diferentes habitats e possuem importantes funções ecológicas na biosfera. Além disso, muitas espécies são utilizadas em vários processos bitecnológicos.

Os fungos filamentosos são definidos como organismos heterotróficos, sem presença de quaisquer plastídeos (cloroplastos e amiloplastos), não apresentam estrutura de reprodução na fase vegetativa, não realizam fagocitose, não executam movimentos ameboides, são formados por hifas microscópicas que no seu conjunto constituem o micélio. Os fungos filamentosos apresentam nutrição por meio da absorção de subprodutos da degradação de substâncias complexas por suas enzimas extracelulares. Em termos de reprodução, os fungos filamentosos apresentam reprodução sexuada, assexuada e parassexual. Além disso, participam de diferentes funções ecológicas harmônicas e desarmônicas no meio ambiente tais como mutualismo, parasitismo e predação.

Fungos filamentosos apresentam diferentes tipos de estruturas de reprodução. Basicamente, eles se reproduzem de forma sexuada, a qual tem como característica básica a troca de material genético para geração de variabilidade genética com significativo gasto de energia. Os organismos atualmente incluídos no reino Fungi são aqueles cujos ciclos de reprodução sexuada são conhecidos. Entretanto, muitos fungos se reproduzem de forma assexuada, onde não ocorre troca de material genético. A reprodução assexuada parece ter a função de dispersão e colonização dos fungos no meio ambiente, pois muitos propágulos assexuados são produzidos com baixo gasto de energia, e por isso representa o principal tipo de reprodução dos fungos. Os fungos que apresentam apenas o ciclo sexuado são chamados de teleomorfos, perfeitos e meióticos. Aqueles que apresentam o ciclo assexuado são denominados como anamorfos, imperfeitos e mitóticos. Um fungo que apresenta os ciclos sexuado e assexuado simultaneamente é chamado de holomorfo. Quando um fungo filamentoso não apresenta qualquer tipo de estrutura de reprodução ele é denominado de micélio estéril.

Em termos taxonômicos, os fungos filamentosos representam um grupo bem heterogêneo com alta plasticidade morfológica. Consequentemente, sua morfologia macro e microscópica, que representa a base para sua

identificação em nível de espécies, é altamente diversificada, o que torna a taxonomia de fungos filamentosos um desafio na micologia. Até o momento, os fungos filamentosos são reconhecidamente divididos em cinco filos básicos dentro do reino Fungi: Chytrydiomycota, Zygomycota, Glomeromycota, Ascomycota e Basidiomycota (Kirk *et al.*, 2008) (Figura 3.1). Entretanto, novos estudos com base na biologia molecular vêm demonstrando que o filo Zygomycota tem origem polifilética, abrigando grupos com características distintas e por isso ainda pode ser subdividido e dar origem a outros novos filos (Blackwell *et al.*, 2011). Além disso, os organismos chamados de microsporidia, antigamente considerados protozoários capazes de causar doenças em animais e humanos, atualmente estão incluídos no reino Fungi como um grupo irmão. Outros organismos, antigamente considerados fungos, estão atualmente agrupados no reino Straminopila e Protista, pois não se enquadram dentro da definição atual aceita para Fungi.

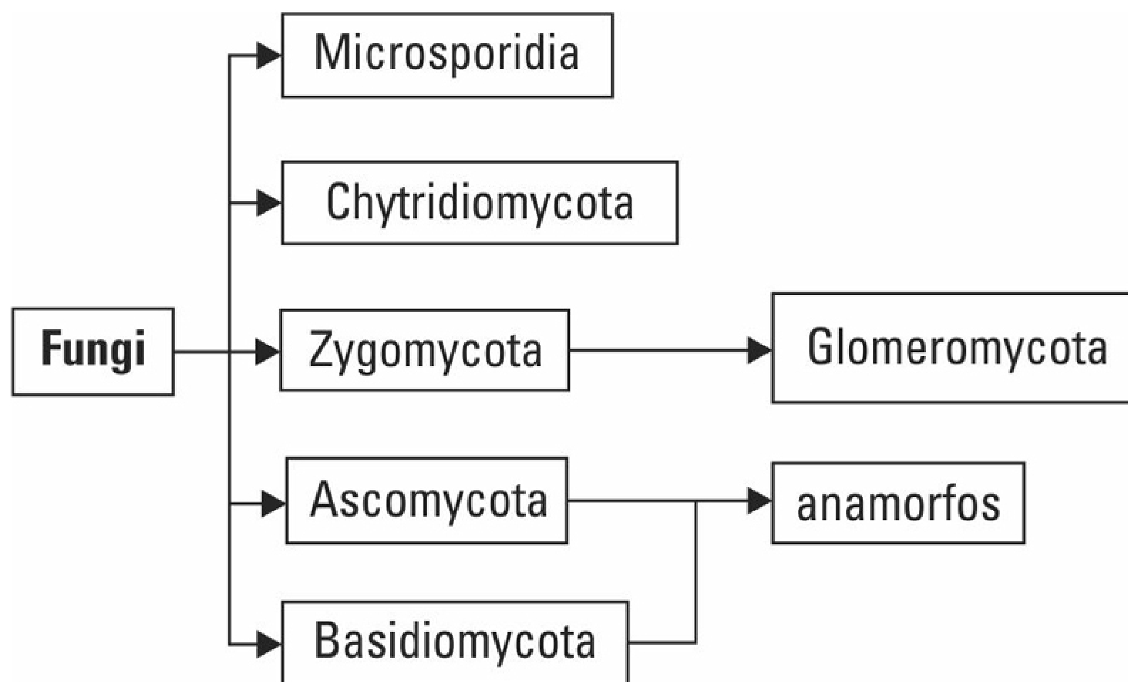


FIGURA 3.1 **Hierarquia taxonômica dos fungos filamentosos.**

3.2. O Reino Fungi

3.2.1. Filo Chytridiomycota

O filo Chytridiomycota representa aproximadamente 1% do total de fungos descritos e parece representar um elo entre os reinos Fungi e Animalia. Geralmente os quitridiomicetos possuem estrutura celular simples e quando maduros formam um esporângio. Dentro dos esporângios se encontram os zoósporos que possuem um flagelo posterior. O flagelo único e sem qualquer ornamentação representa uma característica que diferencia o filo Chytridiomycota dos organismos antigamente considerados fungos que agora fazem parte do reino Straminopila. Os fungos do filo Chytridiomycota são denominados fungos zoospóricos.

Os quitridiomicetos formam um talo simples com formação de hifas cenocíticas (sem septos) desenvolvendo uma forma micelial simples. Eles formam um esporângio onde internamente se encontram os zoósporos flagelados. Os talos dos quitridiomicetos podem habitar a superfície (epibióticos) ou o interior (endobióticos) de diferentes substratos. O ciclo reprodutivo dos quitridiomicetos pode ser visualizado na Figura 3.2.

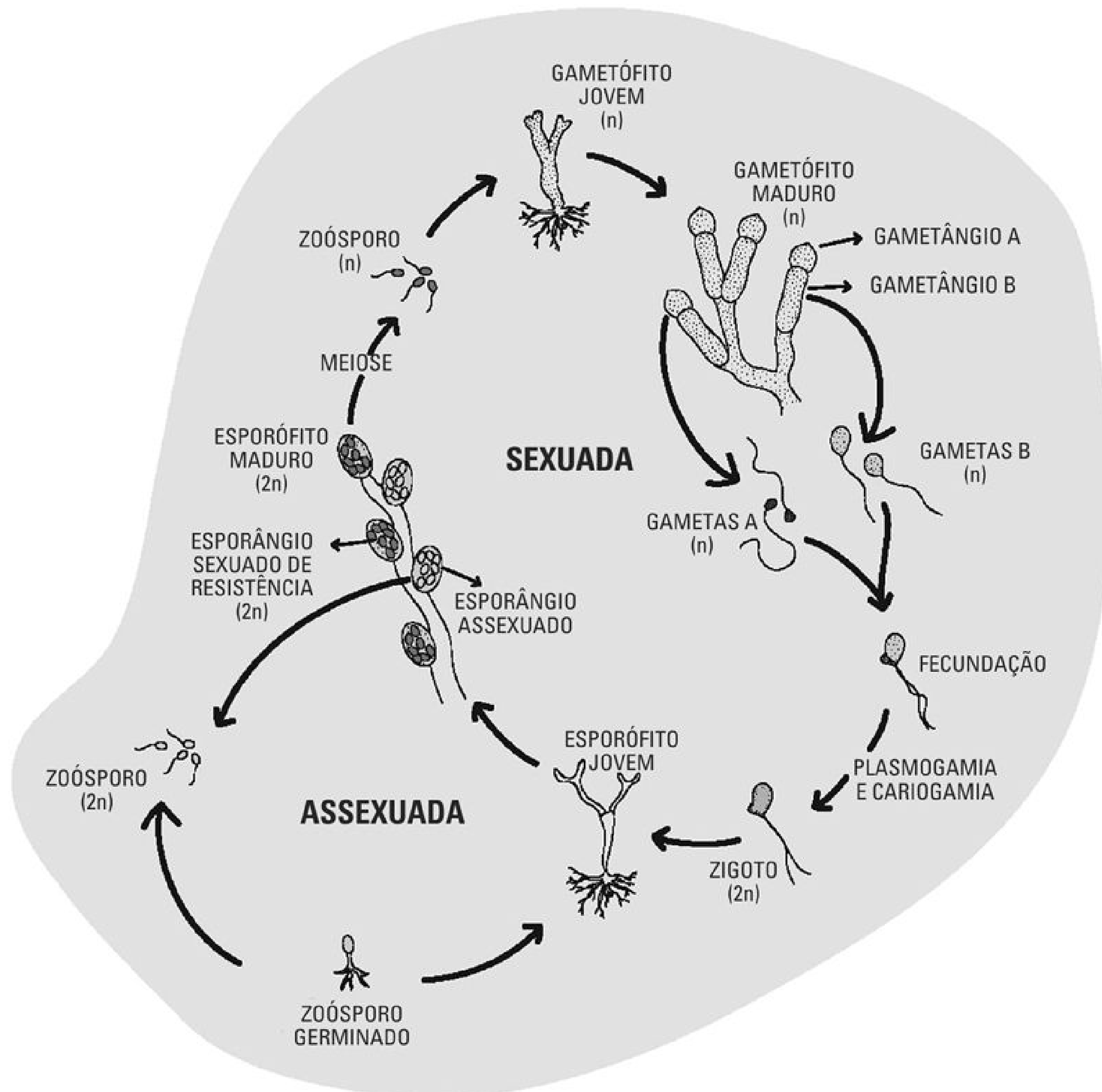


FIGURA 3.2 **Ciclo de vida de *Allomyces*, um quitrídio. Os indivíduos haploides (gametófitos) formam gametângios A e B, que produzem gametas de tamanhos distintos. Os gametas A, que têm cerca da metade do tamanho dos gametas B, são atraídos por hormônios. O zigoto perde seus flagelos e germina para produzir um indivíduo diploide (esporófito), que origina dois tipos de esporângios. Os esporângios assexuados liberam zoósporos diploides, que germinam e repetem a geração diploide. Enquanto que os esporângios sexuados são capazes de resistir às condições críticas do ambiente. Passado o período de dormência, ocorre a meiose com formação de zoósporos haploides. Os zoósporos se desenvolvem em gametófitos, que produzem gametângios na maturidade.** *Fonte*: Imagem por Luiza N. Carvalho.

Os quitridiomicetos são considerados fungos decompositores fracos e algumas espécies parasitas de raízes de vegetais. Algumas espécies são anaeróbias e habitam o rúmem dos ruminantes. Outras podem causar doenças em vertebrados como, por exemplo, o *Batrachochytrium dendrobatidis*, o qual vem causando a morte de diferentes espécies de anfíbios. Além disso, espécies do gênero *Pythium* causam perdas em vegetais hidropônicos.

3.2.2. Filo Zygomycota

O filo Zygomycota é caracterizado por apresentar hifa cenocítica como os quitridiomicetos, mas possui estrutura micelial mais complexa. Geralmente as espécies de zigomicetos apresentam crescimento rápido devido a uma dinâmica corrente citoplasmática resultante da ausência de septos nas hifas. Os zigomicetos são caracterizados pela produção do esporo sexuado denominado de zigósporo após a união gametangial dos *mating types* compatíveis. Também produzem esporângios que internamente abrigam os esporangiósporos assexuados (Figura 3.3).

FIGURA 3.3 **Ciclo de vida do zigomiceto *Rhizopus stolonifer*. Este fungo, assim como a maioria dos outros zigomicetos, se reproduz preferencialmente de modo assexuado por meio de esporos haploides. Aglomerados de esporângios assexuados são ancorados no substrato por "rizoides" e interligados por hifas especializadas "estolão". Com menor frequência ocorre a reprodução sexuada. Duas hifas haploides (de dois diferentes *mating types*, A e B) se fundem (plasmogamia) para formar um**

zigosporângio diploide, com posterior formação dos zigósporos diploides (cariogamia). A subsequente meiose produz o estado haploide, manifestado como um esporângio contendo numerosos esporangiósporos, que são dispersos, e germinam e produzem hifas no substrato. *Fonte*: Imagem por Luiza N. Carvalho.

Os zigomicetos são conhecidos como colonizadores primários devido ao seu crescimento rápido nos diferentes substratos. São considerados decompositores fracos, pois não possuem um sistema enzimático elaborado para degradação de matéria orgânica. Algumas espécies podem ocorrer como oportunistas de vertebrados, incluindo o homem, e causar doenças, levando os pacientes imunossuprimidos à morte.

3.2.3. Filo Glomeromycota

Glomeromycota é um filo relativamente novo, proposto em 2001, a partir da elevação da antiga ordem Glomales (Zygomycota) a um novo filo. Glomales foi elevada em nível de filo, pois inclui fungos com morfologia, função ecológica e genética diferente de outros zigomicetos. Os esporos assexuados (glomerósporos) dos glomeromicetos são grandes quando comparados com os dos outros zigomicetos e demais filos polinucleados. As hifas são cenocíticas. Os glomeromicetos representam os fungos micorrízicos arbursculares (FMAs) e excercem uma relação mutualística colonizando raízes de diferentes espécies vegetais.

O micélio dos glomeromicetos protegem as raízes dos vegetais dos seus hospedeiros contra agressões abióticas (condições desfavoráveis de temperatura, pH, metais pesados, baixa disponibilidade de água) e bióticas (ataques de bactérias, fungos e nematódios) no solo. As hifas dos glomeromicetos vão da rizosfera (região do solo próximo à raiz do vegetal), onde ocorrem estruturas saculares que abrigam os glomerósporos, atravessam o tecido da raiz e vão até o interior da célula vegetal formando o arbúsculo (hifa modificada). Nos arbúsculos ocorre a troca de nutrientes inorgânicos, transportados pelo fungo da rizosfera para o interior da célula vegetal, e obtenção dos fotossintatos produzidos pela planta que o fungo usa como nutrientes.

3.2.4. Ascomycota

O filo Ascomycota é o maior em número de espécies conhecidas do reino Fungi com aproximadamente 64% das espécies descritas. Ele inclui fungos macro (cogumelos) e microscópicos (fungos anamorfos). Formam hifas septadas com diferentes arranjos miceliais (micélios primário, secundário e

terciário). Os ascomicetos produzem a estrutura sexuada asco, que dá nome ao filo, onde internamente ocorrem geralmente oito ascóporos (esporos de origem sexuada) (Figura 3.4). Diferentes espécies de ascomicetos ocorrem na natureza em diferentes formas, habitam vários substratos e apresentam relações ecológicas como sapróbios (decompositores de matéria orgânica), mutualistas (ectomicorrízicos), parasitas (associação para formação dos líquens) ou parasitas de vegetais e animais, além de predadores.

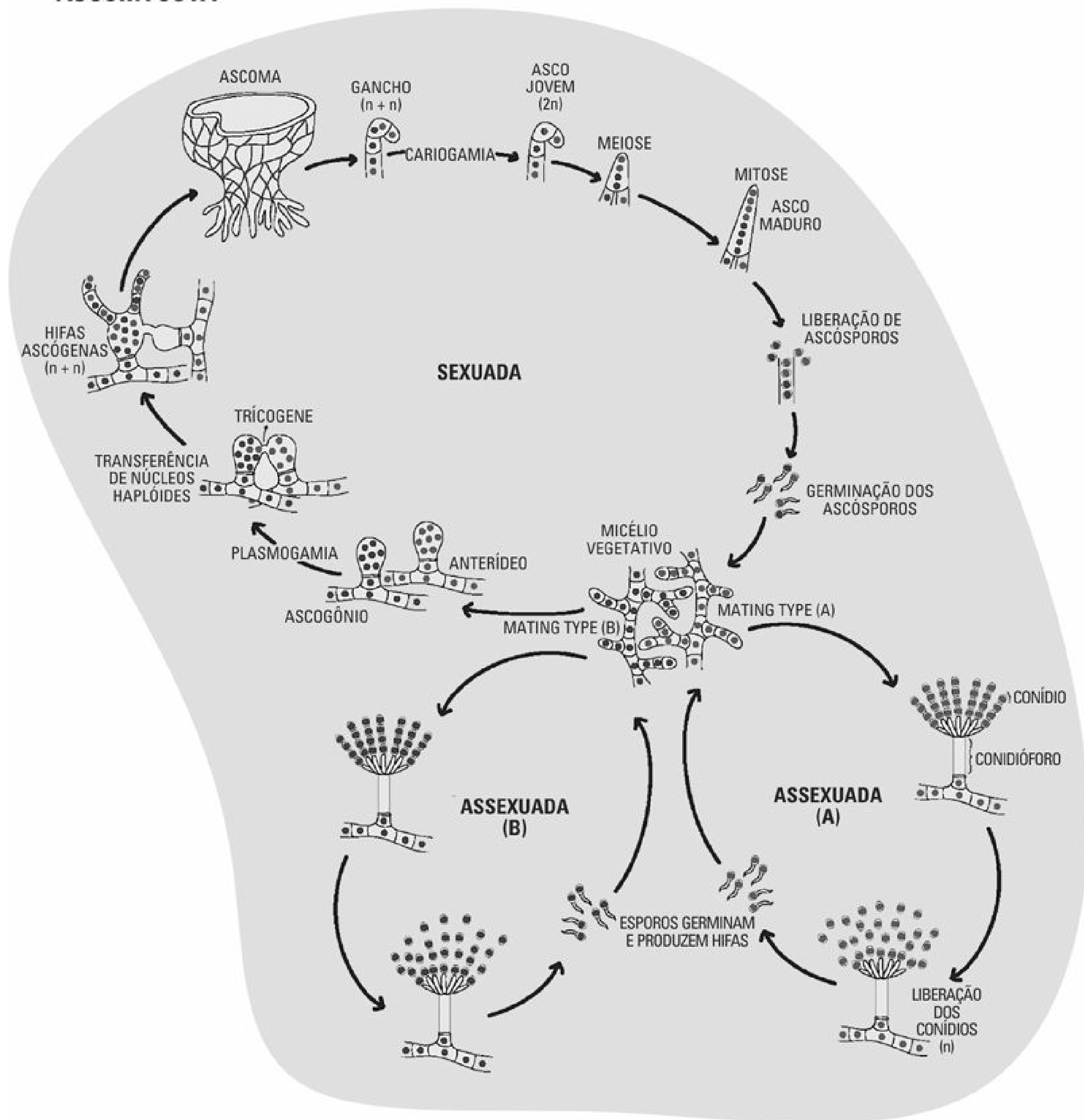


FIGURA 3.4 **Ciclo de vida genérico de um ascomiceto. Na reprodução assexuada, a hifa produz o conidióforo contendo os conídios haploides. Os conídios são liberados, germinam e produzem nova hifa que se desenvolve em micélio. Na reprodução sexuada, ocasionalmente os gametângios haploides (anterídeo, *mating type* A; ascogônio, *mating type* B) se fundem (plasmogamia) e os núcleos haploides do anterídeo são transferidos. As hifas ascógenas formadas produzem o "gancho" e após a cariogamia forma-se o asco diploide. Consecutiva à meiose, ocorre a mitose com a produção dos oito ascósporos.** *Fonte*: Imagem por Luiza N. Carvalho.

3.2.5. Basidiomycota

O filo Basidiomycota, como os ascomicetos, inclui espécies macro e microscópicas com uma enorme plasticidade fenotípica. Possuem formas e cores diversificadas. Os basidiomicetos abrangem cerca de 34% das espécies de fungos conhecidas e incluem os cogumelos (Agaricomycotina) e os fitopatógenos conhecidos como carvões (Ustilaginomycotina) e ferrugens (Pucciniomycotina). Os basidiomicetos são caracterizados pela formação da estrutura sexuada chamada basídio, a qual suporta externamente os esporos sexuados denominados basidiósporos (Figura 3.5).

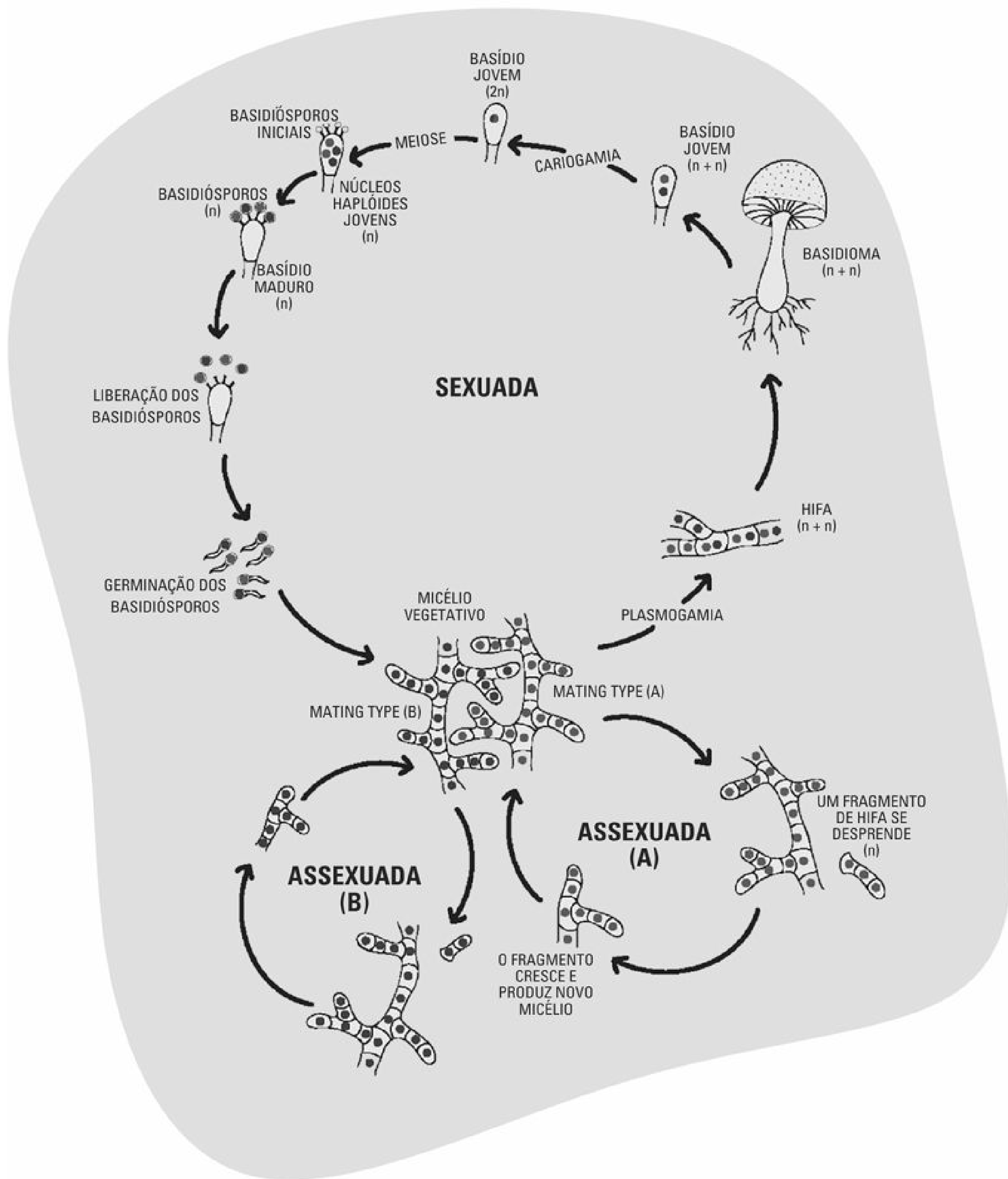


FIGURA 3.5 Ciclo de vida genérico de um basidiomiceto. Na reprodução assexuada, um fragmento de hifa se desprende do micélio vegetativo e cresce para produzir um novo micélio. Na reprodução sexuada, o basidioma surge após a fusão de hifas de dois diferentes *mating types* A e B (plasmogamia). O basídio diploide é formado (cariogamia) e após a meiose os basidiósporos haploides são produzidos. *Fonte*: Imagem por Luiza N. Carvalho.

Os fungos basidiomicetos ocorrem na natureza em diferentes formas e possuem diferentes funções ecológicas. A principal parece ser a decomposição de matéria orgânica, pois algumas espécies possuem sistemas enzimáticos complexos e altamente especializados para degradação da lignina. Além disso, podem ocorrer como parasitas de vegetais e animais, bem como mutualistas (ectomicorrízicos). Muitos basidiomicetos macroscópicos (cogumelos) são comestíveis, mas alguns são tóxicos, venenosos e alucinógenos.

3.3. Ciclos reprodutivos

A taxonomia clássica dos fungos envolve o conhecimento de suas estruturas macro e microscópicas vegetativas e reprodutivas. Os fungos filamentosos têm sua estrutura formada a partir de filamentos de células tubulares microscópicas ligadas chamadas *hifas.* As hifas podem crescer rapidamente permitindo que o fungo colonize diversos ambientes e se alimente por meio da secreção de enzimas extracelulares que atuam no substrato auxiliando sua quebra para posterior absorção dos nutrientes pela parede celular. Os fungos podem apresentar dois tipos distintos de hifas, as *hifas septadas* que contêm paredes celulares transversais, chamadas septos, separando suas células em unidades uninucleadas, ou as *hifas cenocíticas* que não possuem septos e apresentam-se como longas células multinucleadas. Os fungos com hifas septadas normalmente possuem aberturas nos septos, chamadas de poros septais tornando contínuo o citoplasma das células adjacentes. O conjunto de hifas macroscopicamente visível de um indivíduo é chamado *micélio*, o qual é formado pelo conjunto de hifas vegetativas, que obtêm nutrientes, e pelas hifas aéreas ou reprodutivas, responsáveis pela sustentação dos esporos reprodutivos.

Os fungos filamentosos se reproduzem tanto de forma sexuada quanto assexuada pela geração de *esporos*, os quais são formados de uma ou mais células e possuem forma e tamanho eficazes para serem transportados por grandes distâncias, o que explica a sua grande distribuição. Ambos os esporos, sexuados e assexuados, são capazes de germinar e desenvolver-se gerando uma nova hifa e posteriormente um micélio. A reprodução assexuada por fragmentação das hifas é comum para todos os fungos, entretanto a reprodução sexuada ainda não foi descrita para todos os filos do Reino Fungi. Os *corpos de frutificação* são os órgãos que carregam os esporos, eles são os conidioma (assexuado), ascoma e basidioma (sexuados).

Os esporos assexuados são gerados por meio de mitoses em hifas especializadas e ao germinarem formam um indivíduo com a mesma composição genética do fungo parental. Os esporos assexuados podem apresentar diferentes formas e por isso diversos nomes específicos. Entretanto, alguns são mais notórios e são conhecidos como: (1) *conídios*, esporos que se originam das células conidiogênicas, presentes em cadeia no ápice das hifas modificadas chamadas conidióforos, comuns para fungos ascomicetos e basidiomicetos anamorfos; (2) *esporangiósporos,* esporos produzidos nos esporângios, uma bolsa presente no ápice de uma hifa

aérea que recebe o nome de esporangióforo, que é comum para os zigomicetos em que a reprodução assexuada é praticamente universal; (3) *zoósporos*, esporos que possuem um único flagelo liso e posterior e são produzidos em esporângios pelos quitridiomicetos.

Os esporos sexuados são produzidos a partir da reprodução sexuada, que é dividida em três fases: (1) *plasmogamia*, onde ocorre a fusão dos citoplasmas; (2) *cariogamia*, processo de fusão dos núcleos dando origem a um núcleo diploide, que por sua vez passa por um último processo; e (3) *meiose* reducional sendo transformado em um núcleo haploide, formando os esporos sexuais dos quais alguns podem ser recombinantes genéticos. Os esporos e suas respectivas estruturas de suporte, gerados a partir da reprodução sexual, são diferenciados e utilizados para a caracterização de cada filo do reino Fungi.

As hifas da maioria dos **quitridiomicetos** são cenocíticas, com poucos septos na maturidade, e alguns representantes exibem rizoides (hifas modificadas apenas para sustentação do talo ao substrato). A principal distinção dos quitridiomicetos em relação aos outros fungos são suas células móveis características (gametas denominados zoósporos) compostas por um único flagelo liso e posterior. Eles podem apresentar vários modos de reprodução, por exemplo, algumas espécies possuem alternância de geração isomórfica (indivíduos haploides e diploides não são distinguíveis), enquanto outras apresentam alternância de geração heteromórfica (indivíduos haploides e diploides não se parecem um com o outro) (Figura 3.2).

Os **zigomicetos** possuem hifas cenocíticas e produzem esporos sexuados denominados *zigósporos* capazes de se manterem dormentes por longos períodos e resistirem às condições ambientais adversas. Os zigósporos são produzidos a partir de estruturas de paredes espessas denominadas zigosporângios formados após a fusão de dois gametângios (Figura 3.3).

Os glomeromicetos apresentam hifas cenocíticas. A reprodução destes fungos ocorre por meio de esporos assexuados polinucleados (glomerósporos) de paredes espessas que variam em tamanho entre 40-800 µm de diâmetro. Os glomerósporos são produzidos em sáculos na rizosfera e podem ser formados individualmente ou em grupos. Ainda não se sabe a respeito de reprodução sexuada nesses fungos.

Nos ascomicetos as hifas são septadas e a produção dos esporos sexuados, denominados *ascósporos*, ocorre dentro de uma estrutura semelhante a um saco chamada *asco.* No asco ocorre a união dos núcleos compatíveis no interior do ascoma maduro (Figura 3.4).

Nos basidiomicetos as hifas são septadas e a reprodução sexuada conta com a formação dos basidiomas após a fusão de dois micélios de linhagens

distintas. No interior dos basidiomas são produzidos os esporos sexuados chamados *basidiósporos*, em estruturas chamadas de basídios (Figura 3.5).

Os fungos que possuem a capacidade de produzirem esporos sexuados são conhecidos como *teleomorfos*. Por outro lado, fungos exclusivamente assexuados, tais como alguns ascomicetos e basidiomicetos que perderam a capacidade de se reproduzir sexuadamente, são chamados de *anamorfos* (Figura 3.6). Quando o mesmo fungo produz os dois ciclos reprodutivos (sexuado e assexuado) ao mesmo tempo, ele é denominado *holomorfo*. Em alguns destes fungos pode ocorrer o ciclo parassexual (mecanismo não sexual de transferência de material genético), que pode contribuir consideravelmente para a flexibilidade genética e evolutiva em fungos que carecem de um verdadeiro ciclo sexuado. Quando um fungo não produz estruturas sexuadas e assexuadas de reprodução típicas, eles são denominados como micélio estéril.

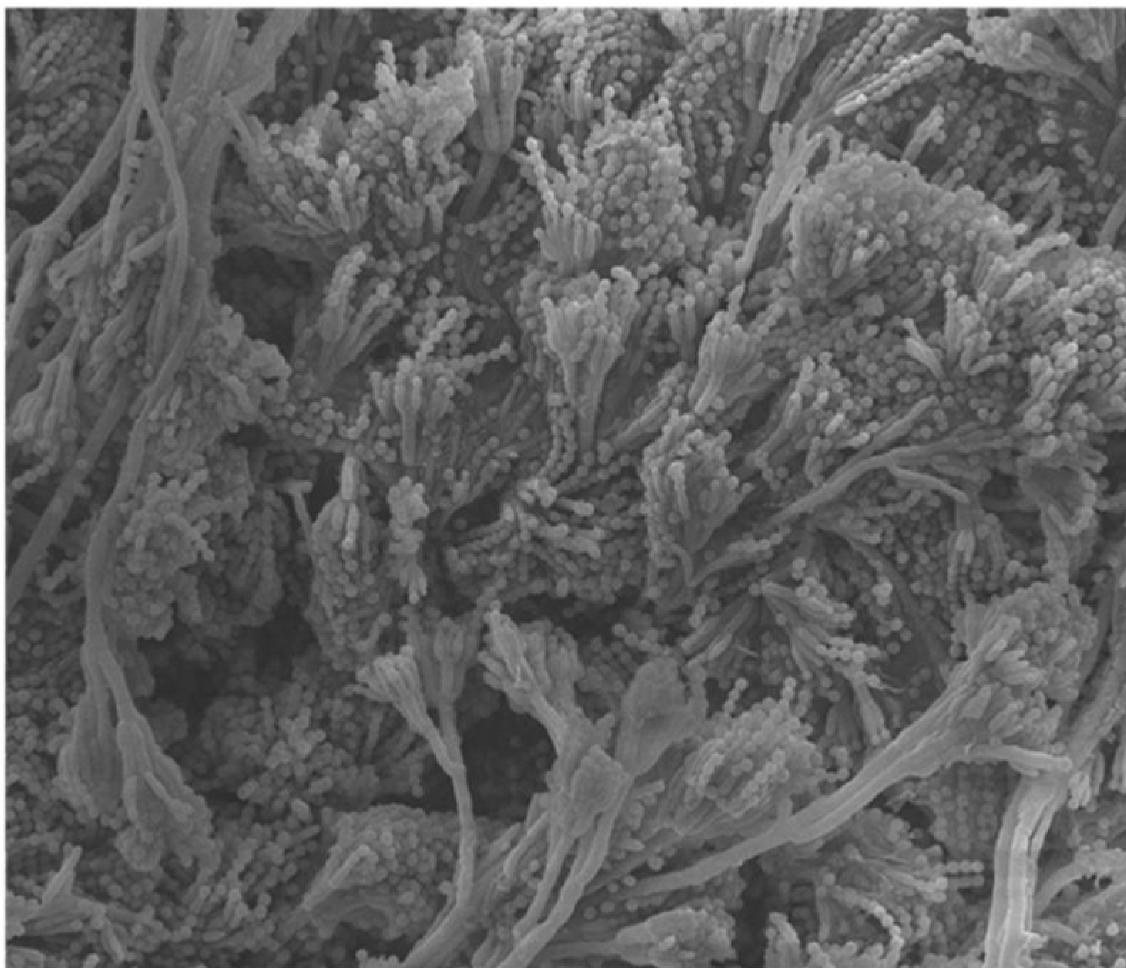


FIGURA 3.6 **Estrutura reprodutiva assexuada completa (conidióforos e conídios) do fungo *Penicilium* sp. Os conídios dispostos em forma semelhante a um pincel. Os conídios e os conidióforos são utilizados na identificação dos fungos assexuados.**

3.4. Habitat e diversidade

3.4.1. Ecossistemas tropicais

As florestas tropicais estão entre as mais ricas em espécies do planeta. Entretanto, pouco ainda é conhecido a respeito da diversidade de fungos tropicais (Peay *et al.*, 2013). O real número de espécies de fungos ainda é desconhecido, mas estima-se que existam cerca de 5,1 milhões de espécies na Terra (incluindo os fungos cultiváveis e não cultiváveis) e que somente cerca de 100 mil foram descritas até o momento (Hawksworth *et al.*, 1991; 2001; Blackwell, 2011). Vale ressaltar que o número de espécies descritas tende a aumentar devido o desenvolvimento e aplicações de metodologias taxonômicas de vanguarda, como, por exemplo, o acesso e caracterização do DNA de fungos presentes no meio ambiente sem o processo de isolamento clássico em meios de cultura.

Os fungos são organismos ubíquos, exibem um nível extraordinário de diversidade morfológica, genética funcional e são essenciais para a manutenção dos diferentes ecossistemas tropicais. A diversidade fúngica nos ecossistemas tropicais exerce importantes papéis ecológicos em relações simbióticas harmônicas e desarmônicas. Os fungos facilitam captação de nutrientes pelas plantas (micorrízicos), protegem suas plantas hospedeiras contra os ataques de fitopatógenos (endofíticos e epifíticos), decompõem matéria orgânica complexa no meio ambiente (decompositores), predam invertebrados na cadeia trófica executando um controle biológico natural nos ecossistemas (predadores) e ainda atuam como agente de doenças (parasitas oportunistas) (Aime e Brearley, 2012).

Entre as comunidades fúngicas mais ricas, diversas e desconhecidas nos ecossistemas tropicais se encontram os fungos endofíticos, os quais habitam tecidos vegetais vivos, em alguma etapa de seu ciclo de vida, sem causar sintomas aparentes de doença ou efeitos negativos aos seus hospedeiros (Bacon e White, 2000). Os endofíticos já foram encontrados em todos os vegetais estudados até o momento e ocorrem em caules, folhas (Carvalho *et al.*, 2012), raízes (Rodriguez *et al.*, 2009), sementes (Hodgson *et al.*, 2014) e espinhos (Qadri *et al.*, 2014). Acredita-se que fungos endofíticos encontrados em ambientes tropicais são componentes extremamente importantes para compreender a biodiversidade fúngica em escala global (Arnold, 2005). Estima-se que a interação entre fungo endofítico e planta hospedeira data de milhões de anos e que ambos os parceiros são beneficiados. Nesta relação simbiótica os fungos recebem nutrição e proteção conferidas pelos hospedeiros; os quais podem conferir à planta

hospedeira tolerância ao estresse biótico e abiótico, aumentar a biomassa e diminuir o consumo de água (Rodriguez *et al.*, 2009). Também são capazes de reduzir a herbivoria causada pelo ataque de insetos (Clay, 1988), auxiliar os hospedeiros na resistência contra fitopatógenos (Tan e Zou, 2001), bem como na captação de nutrientes (Nair e Padmavathy, 2014). Muitos dos fungos endofíticos associados às plantas tropicais são generalistas e pertencem em sua maioria ao filo Ascomycota, sendo os gêneros *Alternaria*, *Botryosphaeria*, *Colletotrichum*, *Fusarium*, *Diaporthe/Phomopsis*, *Nodulisporium*, *Pestalotia*, *Phoma*, *Phyllosticta*, *Trichoderma* e *Xylaria* os mais comumente encontrados e identificados (Suryanarayanan *et al.*, 2002). Além da importância ambiental, os fungos endofíticos se destacam pela extensa produção de metabólitos secundários úteis para o desenvolvimento de novos medicamentos. Dentre estes metabólitos produzidos por fungos endofíticos podemos citar os alcaloides, terpenoides, flavonoides e esteroides; os quais podem apresentar diversas atividades como antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, antitumoral e antiparasitária (Rosa *et al.*, 2011). Acredita-se que os endofíticos de regiões tropicais produzam um maior número de metabólitos ativos quando comparados àqueles presentes em outras regiões (Bills *et al.*, 2002). Como exemplo, dentre as moléculas bioativas produzidas a partir deste grupo de fungos destacamos: cochlioquinona A e isocochlioquinona A, obtidas a partir do fungo endofítico *Cochliobolus* sp., isolado da planta *Piptadenia adiantoides* (Fabaceae), ambos exibem atividade contra *Leishmania amazonensis* (Campos *et al.*, 2008); altenusina, metabólito obtido a partir de extrato do fungo endofítico *Alternaria* sp., isolado da planta *Trixis vauthieri* (Asteraceae), apresenta atividade inibitória frente *Trypanosoma cruzi* (Cota *et al.*, 2008); ofiobolina K e 6-epi-ofiobolina K, substâncias obtidas a partir do fungo endofítico *Aspergillus calidoustus*, isolado da planta *Acanthospermum australe* (Asteraceae), ambas exibiram atividade antifúngica frente fitopatógenos e atividade tripanossomicida contra *T. cruzi* (Carvalho *et al.*, 2015).

Micorriza (do grego "*mykes*" fungo e "*rhizae*" raízes, são associações simbióticas não patogênicas entre fungos do solo e raízes de plantas (Saggin Júnior e Silva, 2006). Nessa interação os fungos conferem à planta hospedeira maior e melhor captação de nutrientes (principalmente P e N), e aumentam a sua resistência contra estresses bióticos (patógenos) e abióticos (metais pesados, baixa disponibilidade de água, elevados níveis de pH, alta salinidade, entre outros); em contrapartida a planta hospedeira repassa de 4-20% dos seus produtos da fotossíntese (fotossintatos) para o fungo (Wright *et al.*, 1998). A maioria dos angiospermas, gimnospermas, pteridófitas e numerosas briófitas formam micorrizas, as quais podem ser

compostas por combinações de diferentes filos de fungos com diferentes grupos de plantas hospedeiras, recebendo assim diferentes denominações (Saggin Júnior e Silva, 2006). Os fungos micorrízicos são divididos em endomicorrízicos (Fungos Micorrízicos Arbusculares – FMA) e ectomicorrízicos (cogumelos dos filos Ascomycota e Basidiomycota), por exemplo.

Os FMAs são caracterizados pela presença endógena de arbúsculos nas células do córtex radicular. Essas interações são formadas entre diferentes espécies vegetais (mais de 80% das plantas terrestres) e fungos do filo Glomeromycota, incluindo membros das classes Archaeosporomycetes, Glomeromycetes e Paraglomeromycetes representados por espécies de *Acaulospora*, *Archaeospora*, *Entrophospora*, *Geosiphon*, *Gigasporamargarita*, *Glomus*, *Paraglomus* e *Scutellospora* (Bücking *et al.*, 2012). Os maiores índices de diversidade de FMAs são descritos para os ecossistemas tropicais e temperados, porém endemismo não foi estabelecido conclusivamente para nenhuma espécie, embora alguns táxons aparentem ter uma distribuição mais limitada do que outras (Morton *et al.*, 2004). Os FMAs exercem grande importância para os ecossistemas tropicais, são os mais encontrados entre as plantas com uso agrícola ou entre as plantas de forma geral, gerando importantes benefícios como: aumento da absorção de vários nutrientes (devido ao aumento de superfície de absorção); sinergismo, aumentando a fixação biológica de N_2 e alterações fisiológicas nas raízes e arredores (Saggin Júnior e Silva, 2006).

O solo é um meio altamente complexo, habitado por inúmeros micro-organismos, dentre os quais os fungos comumente são os mais abundantes (Kjøller e Struwe 1982; Schnürer *et al.*, 1985; Bills *et al.*, 2004). Os fungos encontrados no solo são de grande importância na decomposição de matéria orgânica, armazenamento de carbono e nitrogênio, ciclos biogeoquímicos, estabilização do solo e parasitismo vegetal (Bills *et al.*, 2004). Espécies de fungos pertencentes ao filo Basidiomycota e Ascomycota se destacam pela importância na decomposição de compostos lignocelulósicos em detritos de madeira (Fukasawa *et al.*, 2011), desempenhando um papel chave na reciclagem de nutrientes em ecossistemas florestais (Berrin *et al.*, 2012). Espécies pertencentes à ordem Polyporales (Agaricomycetes, Basidiomycota) são essenciais no ciclo do carbono. Espécies de Polyporales são sapróbios de madeira e são divididos em dois grandes grupos: (1) fungos da podridão branca, aqueles capazes de decompor lignina e celulose e (2) fungos da podridão marrom, os responsáveis pela degradação tanto da celulose quanto da hemicelulose (Binder *et al.*, 2013).

Os fungos são os patógenos de insetos mais comuns e também importantes reguladores da população de insetos (Wang *et al.*, 2016) em processo de controle biológico de pragas. Conhecidos como fungos entomopatogênicos, estes micro-organismos são adequados para o desenvolvimento de biopesticidas devido seu modo de penetração direta na cutícula dos insetos, seguida da multiplicação na hemocele (Wang *et al.*, 2016). Espécies pertencentes ao gênero *Beauveria* (Ascomycota) são os fungos mais frequentemente utilizados no controle biológico de insetos, seguido por espécies de *Metarhizium* (Ascomycota). O processo de infecção envolve: adesão do esporo à cutícula do inseto, penetração da cutícula pelo tubo germinativo, desenvolvimento do fungo dentro do corpo do inseto e colonização da hemocele pelas hifas fúngicas (Augustyniuk-Kram e Kram, 2012). Os esporos dos fungos entomopatogênicos geralmente são cobertos por uma camada de muco composto por proteínas e glucanas, as quais facilitam sua adesão à cutícula do inseto. A germinação dos esporos de alguns fungos entomopatogênicos produz estruturas especializadas chamadas de apressórios, as quais são responsáveis pela adesão do esporo germinado na superfície da cutícula. Por meio de pressão mecânica e atividade enzimática (secreção de lipases, proteases e quitinases), o tubo germinativo do fungo penetra na cutícula do inseto. Dentro do corpo do inseto a maioria dos fungos entomopatogênicos cresce como propágulos nas formas de leveduras, hifas ou protoplastos desprovidos de parede celular, sendo que estas estruturas se espalham através da hemocele. A morte do inseto geralmente resulta do dano mecânico causado pelo crescimento do micélio fúngico dentro do seu corpo (mumificação) ou por toxinas produzidas e liberadas pelo fungo. *Beauveria*, *Metarhizium* e *Tolypocladium* são as espécies mais conhecidas pela capacidade de secretar uma gama de toxinas (Augustyniuk-Kram e Kram, 2012).

3.4.2. Ecossistemas temperados

As regiões que se estendem entre os trópicos e os círculos polares, sejam no Norte ou no Sul do planeta, são conhecidas como temperadas. Elas se caracterizam por estações bem definidas com temperaturas médias de -2°C a 15°C no inverno e verão, respectivamente. Nesses ecossistemas, as florestas representam um dos maiores biomas do planeta, cobrindo uma área de 570 milhões de hectares e desempenhando um importante papel no fluxo de carbono global (Voříšková *et al.*, 2014). Nos ecossistemas temperados, os fungos possuem função primordial na decomposição da matéria orgânica e ciclagem dos nutrientes em baixas temperaturas (Voříšková *et al.*, 2014). A diversidade fúngica nos ecossistemas temperados

vem sendo catalogada, embora muitos táxons ainda sejam desconhecidos (Callan e Carris, 2004). As regiões temperadas são caracterizadas pela abundância de táxons cosmopolitas (Callan e Carris, 2004).

Enquanto alguns gêneros fúngicos parecem ser endêmicos de ambientes frios, gêneros como *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium*, considerados cosmopolitas, são obtidos de solos em regiões temperadas (Bills *et al.*, 2004). Por outro lado, táxons como *Mortierella alpina*, *M. vinacea*, *M. isabellina*, *M. nana*, *Paecilomyces lilacinus*, *P. carneus*, *Penicillium restrictum*, *P. daleae*, *P. janczewskii* e *Torulomyces lagena* são encontrados nos ambientes temperados.

3.4.3. Ecossistemas frios

Aproximadamente 85% da Terra apresentam temperaturas frias (abaixo de 5°C) de forma permanente ou sazonalmente (Hoshino e Matsumoto, 2012), incluindo habitats ao nível do alto-mar até as altas montanhas, bem como regiões da Antártica e do Ártico (Margesin e Miteva, 2011). As regiões polares são ambientes extremos, pois são dominadas por baixas temperaturas, intensa incidência de radiação ultravioleta, baixa disponibilidade de água e nutrientes e fortes ventos (Anisimov *et al.*, 2007). Estas características representam fatores limitantes à vida com a predominância dos micro-organismos. Os ecossistemas terrestres frios do planeta incluem as altas montanhas (alpino), o Ártico e a Antártica.

Ambientes alpinos ocorrem em um clima de baixa temperatura, onde as temperaturas não excedem a faixa de 8°C (Korner e Paulsen, 2004). O termo "alpino" é comumente utilizado para áreas montanhosas onde não ocorrem árvores de grande porte e com temperaturas baixas. Estes ambientes podem ser encontrados dos trópicos ao extremo norte (Grabherr *et al.*, 2000). Além disso, a densidade do ar, disponibilidade de água e sazonalidade são específicos para cada região montanhosa. Nestes ambientes os fungos são encontrados no solo realizando ciclagem de nutrientes (Zinger *et al.*, 2009), nas plantas em relações simbióticas (micorrízas) (Bjorbækmo *et al.*, 2010) e nas rochas (Selbmann *et al.*, 2014) podendo causar intemperismo. Diferentes espécies de fungos filamentosos pertencentes aos filos Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota e Glomeromycota, bem como vários anamorfos, ocorrem com frequência nos ambientes alpinos.

Para o Ártico foram reportadas em torno de 2.600 espécies de fungos até o momento, dos quais fazem parte filos Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota, Chytridiomycota e Glomeromycota (Meltofte *et al.*, 2013). Estes fungos são encontrados em todos os ecossistemas do Ártico colonizando substratos como solos (Idid *et al.*, 2014), tundra (Lydolph *et*

al., 2005), plantas (Mundra *et al.,* 2016), ambientes salinos (Cantrell *et al.,* 2001), *permafrost* (Kochkina *et al.,* 2012) e executam uma ampla variedade de funções ecológicas, algumas das quais ainda não são bem entendidas (Hassan *et al.,* 2016). Entre as comunidades de fungos do Ártico, os micorrízicos são comuns e importantes para o crescimento e sobrevivência das suas plantas hospedeiras. Dentre as espécies de fungos micorrízicos encontrados, destacam-se representantes dos gêneros *Inocybe, Cortinarius, Hebeloma, Russula, Thelephora, Tomentella, Cenococcum*e *Laccaria* (Fujiyoshi *et al.,* 2011; Mundra *et al.,* 2016).

A distribuição de fungos na Antártica está relacionada com os diferentes fatores abióticos extremos, bem como os diferentes substratos presentes na região tais como solos (Arenz e Blanchette, 2011), rochas (Selbmann *et al.,* 2005), vegetação (Rosa *et al.,* 2010; Zhang *et al.,* 2013), macroalgas (Godinho *et al.,* 2013), lagos (Gonçalves *et al.,* 2012) neve e gelo (Price, 2000; Elster *et al.,* 2007). Cerca de 99% dos fungos (pouco mais de 1.000 espécies) citados para a Antártica até o momento pertencem aos filos Ascomycota, Basidiomycota, Zygomycota, Chytridiomycota e Glomeromycota (Onofri *et al.,* 2005; Bridge *et al.,* 2008). Estas espécies incluem táxons cosmopolitas adaptados ao frio, psicrotolerantes e psicrofílicos. Espécies dos gêneros *Antarctomyces*, *Cadophora*, *Geomyces* e *Thelebolus* possuem representantes psicrofílicos que estão amplamente presentes em diversos locais e substratos da Antártica (De Hoog *et al.,* 2005; Brunati *et al.,* 2009; Blanchette *et al.,* 2010). As comunidades de fungos possuem papel importante na complexidade trófica das comunidades microbianas da Antártica (Rao *et al.,* 2012) e parecem desempenhar um papel chave na ciclagem de nutrientes nos ecossistemas antárticos (Shivaji e Prasad, 2009).

A reprodução dos fungos nos ambientes frios ocorre principalmente por meio do crescimento micelial e/ou produção de esporos assexuais. A reprodução sexuada é menos frequente; provavelmente para economizar energia durante o ciclo de vida e gerar vários propágulos para dispersão e sobrevivência em condições extremas (Ruisi *et al.,* 2007). Os fungos que vivem nas regiões frias adaptaram-se às duras e extremas condições de pouca disponibilidade de nutrientes e baixas temperaturas por meio de diferentes mecanismos. Sua fisiologia e ecologia adaptativa ainda são pouco caracterizadas, porém, sabe-se que tais mecanismos de adaptabilidade incluem alterações na membrana lipídica, adaptações na configuração de ácidos graxos, aumento de produção de enzimas frio-ativas, solutos compatíveis, trealose, bem como a produção de melanina e micosporinas (Robinson, 2001; Hassan *et al.,* 2016). Tais características adaptativas às condições extremas hostis tornam estes fungos alvos promissores de estudos taxonômicos, ecológicos, evolutivos e biotecnológicos.

3.5. Aplicações biotecnológicas

Os fungos filamentosos são micro-organismos de grande importância biotecnológica. Devido a sua capacidade de produzir uma variedade de macro e micromoléculas, eles contribuem na indústria farmacêutica e na agricultura. Os fungos estão presentes nos processos de biodegradação de poluentes e produção de enzimas de interesse industrial. Também são de grande importância agrícola e ecológica, pois, além de participar dos ciclos biogeoquímicos, eles podem ser usados no controle biológico de organismos que causam prejuízos à agricultura. E, finalmente, são utilizados na produção de alimentos e produtos fermentados ou consumidos *in natura*, uma vez que são apreciados, cultivados e comercializados na indústria alimentícia e na medicina popular.

3.5.1. Micromoléculas

Os fungos produzem substâncias que não são, aparentemente, necessárias para seu crescimento e desenvolvimento, como resultado do seu metabolismo secundário, sendo normalmente produzidas em resposta a condições ambientais específicas (Demain, 1981). Os metabólitos secundários (micromoléculas) produzidos pelos fungos são conhecidos como produtos naturais e são definidos como moléculas de baixo peso molecular (150 a 1.000 Da) e extremamente variáveis quanto à estrutura química (Bérdy, 2005). Geralmente apresentam em sua estrutura átomos como C, H, S e N, algumas vezes P e átomos clorados, tais como grupo Cl, Br e F (Bérdy, 2005). Os grupos funcionais mais importantes são hidroxila, carboxila, carbonila e amino, compondo mais de 20 grupos químicos diferentes (Zhong e Xiao, 2009), os quais incluem os antibióticos e toxinas por exemplo.

Os produtos naturais fúngicos se destacam pela ampla aplicação biotecnológica nos campos da medicina veterinária e humana, na agricultura e na indústria. Durante os primeiros anos de descoberta de produtos naturais microbianos, os novos antibióticos foram encontrados com relativa facilidade a partir de processos fermentativos (Katz e Baltz, 2016). Posteriormente, abordagens químicas e genéticas foram utilizadas para aprimorar a atividade das substâncias já conhecidas. O exemplo clássico de um metabólito secundário produzido por fungo é o da penicilina, descoberto acidentalmente por Alexander Fleming em 1928, que observou a inibição do crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus* numa

placa de Petri contendo uma contaminação com o fungo *Penicillium notatum*. Tal descoberta revolucionou a história da medicina terapêutica e proporcionou o tratamento de soldados durante a II Guerra Mundial com infecções bacterianas. A partir de 1990, a taxa de descoberta de novos produtos naturais bioativos caiu drasticamente, pois a indústria farmacêutica concentrou esforços na triagem de alto rendimento de substâncias sintéticas contra possíveis novos alvos terapêuticos identificados pelo projeto de sequenciamento do genoma humano. No entanto, com a ampliação do conhecimento dos genomas microbianos, sabemos que micro-organismos com genomas extensos podem ser capazes de produzir até 10 vezes o número de metabólitos secundários já conhecidos (Katz e Baltz, 2016). Isso reforça a importância de pesquisas que visem explorar a biodiversidade de fungos e seu potencial como fonte de moléculas com diferentes atividades biológicas.

Os fungos filamentosos são produtores de produtos naturais conhecidos como heterocíclicos, os quais constituem o maior grupo dentre as substâncias orgânicas mais abundantes com relevância biológica (Zhong e Xiao, 2009). Os heterocíclicos constituem quase 1/3 dos produtos naturais conhecidos, tais como vitaminas, hormônios, antibióticos, alcaloides, assim como produtos farmacêuticos, herbicidas e corantes. Além disso, os fungos filamentosos também são especializados em produzir os policetídeos, um grupo altamente diverso em relação à sua estrutura química (Zhong e Xiao, 2009). Estas substâncias são descritas como ativas contra diferentes micro-organismos (antimicrobiana), células tumorais (anticâncer) e frente ao sistema imune (imunossupressora) (Zhong e Xiao, 2009).

Os terpenos produzidos pelos fungos (diterpenos, triterpenos e sesquiterpenos) apresentam atividades biológicas interessantes (Zhong e Xiao, 2009). O exemplo mais conhecido de diterpeno é o paclitaxel (taxol), primeiro fármaco utilizado para o tratamento de câncer a alcançar o mercado de bilhões de dólares. O taxol foi descoberto em pequenas quantidades na casca da planta medicinal *Taxus brevifolia* (Taxaceae), a qual apresenta crescimento lento na região do noroeste do Pacífico. No entanto, o taxol foi posteriormente descoberto a partir do cultivo do fungo endofítico simbionte *Taxomyces andreanae* associado a *T. brevifolia* (Stierle *et al.*, 1995). Mais tarde, outras espécies e gêneros de fungos endofíticos, como *Seimatoantlerium tepuiense*, *Seimatoantlerium nepalense* (Bashyal *et al.*, 1999), *Tubercularia* sp. (Wang *et al.*, 2000) e *Metarhizium anisopliae* (Liu *et al.*, 2009) também demonstraram ser capazes de produzir o taxol.

Os fungos também são produtores de diferentes ácidos graxos, os quais são conhecidos por possuir diferentes propriedades biológicas, como antibacteriana, antimalárica e antifúngica (Pohl *et al.*, 2011). Os ácidos

graxos produzidos pelos fungos são capazes de perturbar estruturalmente a membrana plasmática de outros organismos causando uma desorganização generalizada que leva a alterações de conformação das proteínas de membrana, a libertação de componentes intracelulares, desordem citoplasmática e, eventualmente, desintegração celular. Além disso, os ácidos graxos também podem agir na inibição de enzimas envolvidas na síntese de lipídeos (Carballeira *et al.*, 2005; 2007; Carballeira, 2008).

Diante do exposto, é possível entender a importância dos estudos acerca da biodiversidade de fungos em diferentes ambientes do planeta e sua utilização como fonte de metabólitos secundários protótipos para o desenvolvimento de medicamentos e pesticidas menos tóxicos para uso na agricultura. Atualmente, genomas completos de fungos bioativos vêm sendo sequenciados para localização dos genes responsáveis pela síntese de substâncias bioativas. Estes estudos de vanguarda podem abrir várias possibilidades para o acesso de uma elevada variedade de substâncias bioativas para uso em processos biotecnológicos.

3.5.2. Macromoléculas

As macromoléculas produzidas por fungos incluem os carboidratos, proteínas e lipídeos responsáveis por realizar uma série de importantes funções biológicas no meio ambiente, mas também com inúmeras aplicações em processos industriais. As macromoléculas produzidas pelos fungos vêm sendo utilizadas em processos que vão da decomposição dos restos de plantas e animais, tornando possível a reciclagem dos elementos químicos, até a utilização na indústria de alimentos (produção de bebidas, queijos) e farmacêutica (medicamentos).

3.5.2.1. Enzimas

Os fungos são capazes de produzir diversas enzimas (amilases, aminoglucosidases, celulases, pectinases, lacases/ligninases, fitase, proteases, lipases e glicose-oxidases). Muitas dessas enzimas são utilizadas como catalisadores em processos de biotransformação. Outras podem ser utilizadas em processo de biodegradação e biorremediação de solos contaminados com poluentes (Ward, 2012). Os fungos se destacam quanto à produção de enzimas devido à sua facilidade de cultivo, secretando suas enzimas diretamente no substrato em que se encontram, não necessitando de ruptura celular para sua liberação. Proteases, amilases e celulases se destacam como os principais grupos de enzimas utilizadas na indústria de detergentes, alimentícia, álcool combustível e têxtil. Vários estudos

descrevem a produção de enzimas ativas por meio de culturas fúngicas a partir do início do século XIX. Um resumo acerca das principais enzimas produzidas por fungos, bem como suas aplicações, se encontra na Tabela 3.1.

Tabela 3.1

Enzimas produzidas por fungos e utilizadas em processos industriais

Enzima	Espécie de fungo	Aplicação industrial
α-Amilase	*Aspergillus niger*, *A. oryzae*	Panificação
Glucoamilase	*Aspergillus niger*, *A. awamori*, *A. oryzae*, *A. phoenicis*, *Rhizopus delemar*, *R. niveus*	Processamento do amido
Protease	*A. niger*, *A. melleus*, *A. oryzae*, *R. delemar*	Laticínio e alimentícia
Renina	*Mucor miehei*, *M. pusillus*	Fabricação de queijo
Glicose oxidase	*Aspergillus niger*	Química, farmacêutica, alimentícia, bebidas
Fitase	*Aspergillus niger*, *A. awamori*, *Trichoderma reesei*, *Thermomyces lanuginosus*	Suplementação alimentar
Pectinase	*Aspergillus niger*, *A. oryzae*, *Humicola insolens*	Bebidas (sucos e vinhos), têxtil e papel
Xilanase	*Trichoderma reesei*, *A. sojae*	Alimentícia, bebidas (sucos e vinhos)
Lipase	*Mucor miehei*	Alimentícia, laticínio, farmacêutica, detergente, têxtil, biodiesel e cosmético
Inulinase	*Aspergillus niger*	Alimentícia e farmacêutica

Fonte: Nguyen *et al.* (2015).

As amilases produzidas por fungos apresentam grande destaque. Elas estão entre as mais importantes e antigas enzimas hidrolíticas utilizadas em diversos processos industriais e de grande importância na biotecnologia (Pandey *et al.*, 2000; Nguyen *et al.*, 2015). Diferentes espécies de fungos já foram reportadas quanto à capacidade de sintetizar essas amilases, conforme demonstrado na Tabela 3.1. As amilases possuem diversas aplicações na indústria de alimento, detergente, bebidas, ração animal, papel, têxteis e panificação (Pandey *et al.*, 2000; Guimarães *et al.*, 2006). Como exemplos, a α-amilase é responsável por catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas α-1,4 em amido para produzir glicose, maltose e dextrinas (Gupta *et al.*, 2003; Nguyen *et al.*, 2015), a qual é utilizada em indústria de panificação, têxtil, papel e detergente (Gupta *et al.*, 2003). Já as glucoamilases catalisam a hidrólise de polímeros à base de glicose, tais como amido a fim de obter glicose e α-dextrina, com menor grau de polimerização (Nguyen *et al.*, 2015). A principal aplicação da glucoamilase é a sacarificação de amido/dextrina parcialmente processado à glicose, que é um substrato essencial para numerosos processos de fermentação, além de

ser utilizada em indústrias de alimentos e bebidas (Kumar e Satyanarayana, 2009).

As proteases são enzimas degradativas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas existentes em molécula de proteína dando origem a peptídeos menores e aminoácidos livres (Rao *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 2015). Elas desempenham um papel essencial no crescimento e sobrevivência de todos os organismos vivos, além de exercerem grande importância comercial. Podem ser subdivididas em dois grandes grupos, exopeptidases e endopeptidases, dependendo do seu sítio de ação (posição da ligação peptídica a ser clivada) (Rao *et al.*, 1998). As proteases são classificadas como ácidas, neutras e alcalinas, baseado no pH ótimo de atividade (Nguyen *et al.*, 2015). As proteases fúngicas já foram descritas para espécies de *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola*, *Thermoascus* e *Thermomyces* (Rao *et al.*, 1998; Nguyen *et al.*, 2015; Souza *et al.*, 2015). As proteases possuem uma ampla variedade de aplicações, podendo atuar nas indústrias de alimentos (fabricação de queijo, preparação de hidrolisados de soja e amaciamento de carne), panificação (endo e exoproteinases de *Aspergillus oryzae* são utilizadas para modificar o glúten do trigo), detergente, tratamento de couro, processos de biorremediação, indústria farmacêutica (fabricação de pomadas para desbridamento de feridas) e cosmética (Rao *et al.*, 1998; Souza *et al.*, 2015).

As celulases representam um complexo capaz de atuar sobre materiais celulósicos, promovendo sua hidrólise, e são extremamente importantes, pois catalisam a liberação de açúcares como a glicose, a qual desperta interesse industrial devido à possibilidade de sua conversão em etanol (Castro e Pereira Jr., 2010). Dentre os fungos capazes de degradar resíduos lignocelulósicos, destacam-se aqueles pertencentes ao gênero *Trichoderma*, em especial *T. reesei*, bem como diferentes espécies de basidiomicetos macroscópicos (cogumelos).

As lipases são hidrolases que catalisam tanto a hidrólise quanto a síntese de ésteres formados por glicerol e ácidos graxos de cadeia longa (Singh e Mukhopadhyay, 2012; Nguyen *et al.*, 2015). Várias espécies de fungos produzem lipases, tais como as dos gêneros *Aspergillus*, *Botrytis*, *Penicillium*, *Trichosporon*, *Rhizopus*, *Geotrichum*, *Fusarium*, *Absidia*, *Cunninghamella*, *Curvularia* e *Mucor* (Jacobsen e Poulsen 1995; Toida *et al.*, 1998; Chahinian *et al.*, 2000; Herrgard *et al.*, 2000; Knight *et al.*, 2000; Namboodiri e Chattopadhaya 2000; Macedo *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2004; Gopinath *et al.*, 2005). As lipases produzidas por fungos possuem importantes aplicações biotecnológicas nas indústrias de alimentos, detergentes, farmacêutica, couro, têxtil, cosméticos e papel.

3.5.2.2. Polissacarídeos

Os polissacarídeos são macromoléculas naturais encontradas em todos os organismos vivos (Silva *et al.,* 2006). Estas macromoléculas se diferem em função de suas características estruturais, como unidade e o grau de ramificação, dos tipos de ligações e do comprimento de suas cadeias (Silva *et al.,* 2006). Os fungos são capazes de produzir diferentes polissacarídeos extracelulares (EPS) durante o processo de fermentação (Silva *et al.,* 2006). Estes polissacarídeos são mais conhecidos por suas propriedades espessantes, geleificantes e emulsificantes; porém, outra possibilidade de aplicação destes biopolímeros é na saúde humana, devido a suas possíveis ações antitumoral, antiviral, anti-inflamatória, hipoglicêmica e imunoestimulante (Silva *et al.,* 2006).

O primeiro exopolissacarídeo comercializado produzido por fungo foi a pululana sintetizada por *Aureobasidium pullulans* (Silva *et al.,* 2006). A pululana é resistente ao óleo, sendo aplicada na exploração de petróleo (Silva *et al.,* 2006). Exemplos de fungos produtores de outros EPS são *Botryosphaeria rhodina* (Selbmann *et al.,* 2003; Vasconcelos *et al.,* 2008), *Ganoderma lucidum* (Zhang *et al.,* 2000), *Sclerotium rolfsii* (Farina *et al.,* 1998), *Phoma herbarum*, *Phytophthora parasitica*, *Tremella mesenterica* (Silva *et al.,* 2006).

3.5.3. Biorremediação

Como eucariotos, os fungos são capazes de sobreviver na presença de poluentes devido à síntese de enzimas incomuns catalizadoras de reações quimicamente não usuais (Viswanath *et al.,* 2008; Sharaddha *et al.,* 2011). A versatilidade enzimática dos fungos os torna organismos de fundamental importância no ambiente, participando de processos de ciclagem de nutrientes e limpeza de poluentes naturais e sintéticos. A utilização de organismos na remoção ou detoxificação de substâncias tóxicas ou indesejáveis ao ambiente é conhecida como *biorremediação*. Os fungos podem ser utilizados para a degradação de diferentes agentes poluentes, tais como óleos e derivados do petróleo, pesticidas, metais pesados, entre outros (Madigan *et al.,* 2010).

Os fungos ascomicetos possuem um importante papel na biorremediação de ambientes naturais. Alguns deles representam potenciais agentes para aplicações em processos de biorremediação, onde o ponto chave do processo parece ser sua maquinaria enzimática intracelular adaptada à degradação de poluentes. Algumas enzimas podem promover a acumulação de metabólitos tóxicos dentro de organelas; outras (como

enzimas citocromo P450, epóxido-hidrolases, glicosiltransferases, sulfotransferases e glutationa S transferases) metabolizam os poluentes e são capazes de degradar substâncias recalcitrantes como hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (Aranda, 2016). As espécies de fungos basidiomicetos são importantes degradadores de poluentes recalcitrantes tais como fenóis, naftóis, bifenóis, corantes têxteis fenólicos ou não fenólicos, compostos aromáticos halogenados, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, entre outros (Kues, 2015). O grande potencial de biodegradação exibido pelos basidiomicetos parece ser devido ao seu rico suprimento de enzimas como as lacases, tirosinases e vários tipos de peroxidases (manganês peroxidase e lignina peroxidase) (Kues, 2015; Martínková *et al.*, 2016).

3.5.3.1. Biorremediação: hidrocarbonetos, pesticidas e metais pesados

Para descontaminação de ambientes marinhos onde ocorreram acidentes de derramamentos de hidrocarbonetos, a utilização da biorremediação é considerada uma das mais importantes tecnologias ecologicamente favoráveis e de baixo custo (Xue *et al.*, 2015). A biorremediação dos hidrocarbonetos poluentes permite uma decomposição parcial ou total dos derivados do petróleo em substâncias menos tóxicas ou não tóxicas (Xue *et al.*, 2015). Geralmente, os derivados do petróleo são biodegradados por meio da sequência de três processos: (1) os compostos do petróleo são absorvidos na superfície fúngica, (2) eles são transferidos para a membrana das células fúngicas e (3) estes compostos são degradados em pequenas moléculas dentro da célula fúngica (Atlas, 1995; Xue *et al.*, 2015).

Estudos recentes têm mostrado que os mecanismos de degradação dos diferentes derivados do petróleo estão relacionados com um processo de oxidação (Yumoto *et al.*, 2002; Robador *et al.*, 2009). No entanto, as vias de degradação destes compostos são distintas devido às suas diferenças químicas (Xue *et al.*, 2015). Os hidrocarbonetos alifáticos alcanos e ciclo alcanos são degradados por oxidação subterminal até CO_2 e H_20, enquanto os hidrocarbonetos aromáticos e policíclicos aromáticos são oxidados até acetilcoenzima A (Yumoto *et al.*, 2002; Singh, 2006; Xue *et al.*, 2015). Diferentes gêneros de fungos foram reportados como capazes de degradar poluentes derivados do petróleo como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Mucor*, *Penicillium*, *Geotrichum* e *Gliocladium* (Xue *et al.*, 2015).

Os pesticidas são as substâncias xenobióticas (substâncias sintéticas que não ocorrem naturalmente) mais amplamente distribuídos no meio

ambiente e incluem, principalmente, herbicidas, inseticidas e fungicidas (Madigan *et al.*, 2010). Apesar dos seus benefícios agrícolas, os pesticidas são muitas vezes considerados uma grave ameaça ao meio ambiente devido à sua natureza persistente e pelas anomalias que podem ocasionar em diferentes organismos do ecossistema (Madigan *et al.*, 2010; Maqbool *et al.*, 2016). Os fungos são potenciais organismos capazes de mineralizar diferentes tipos de pesticidas. Eles podem apresentar diferentes processos biodegradativos, incluindo a hidroxilação, desmetilação, descloração, desoxigenação, esterificação, desidrocloração e oxidação dos pesticidas contendo diferentes grupos funcionais (Maqbool *et al.*, 2016). Os fungos utilizam as enzimas lacases, hidrolases, peroxidases, esterases, desidrogenases, manganês peroxidases e lignina peroxidases no processo de degradação de pesticidas (Maqbool *et al.*, 2016). Entre as espécies capazes de degradar pesticidas se destacam as dos gêneros *Aspergillus*, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Streptomyces*, *Phanerochaete*, *Rhizopus*, *Trametes*, *Lentinus* e *Mortierella* (Maqboole *et al.*, 2016).

Muitos rejeitos industriais contendo metais pesados são despejados em efluentes em desacordo com os padrões estabelecidos pela legislação vigente (Lemos, 2008). A utilização dos fungos para a despoluição dos efluentes contendo metais pesados se dá pela imobilização do metal por meio de três mecanismos principais: (1) biossorção dos metais na biomassa: adsorção nas paredes celulares, pigmentos e polissacarídeos extracelulares; (2) acumulação e sequestro intracelular; ou (3) biomineralização: precipitação de compostos metálicos sobre e/ou em torno das hifas (Gadd, 2010, 2007). Algumas recentes aplicações de fungos biossorventes na biossorção de metais estão resumidas na Tabela 3.2. A Figura 3.7 ilustra exemplos destes três mecanismos.

Tabela 3.2
Espécies de fungos utilizados como biossorventes

Espécie de fungos	Metal pesado	Espécie de fungos utilizados como biossorvente	Metal pesado
Aspergillus sp.	Cr, Ni, U, Cd, Zn, Cu, Co, Pb, Mn, Hg, Sr, As	*Rhizopus* sp.	Zn, U, Cu, Co, Cr, Pb, Cd, Ni, Am
Mucor rouxii	Pb, Cd, Ni, Zn, Cu	*Agaricus* sp.	Al, Cu Cd, Pb, Cr
Penicillium sp.	Ni, Zn, Pb, As, U, Th, Sr, Cd, Hg	*Phanerochaete chrysosporium*	Cu, Pb, Cd
Cunninghamella echinulate	Pb, Cu, Zn	*Trametes* sp.	Al, Cd
Cladosporium cladosporioides	Au	*Talaromyces helicus*	Cu
Amanita muscaria	Al	*Ganoderma lucidium*	U
Helminthosporium solani	Mn	*Pycnoporous sanguineus*	Cu

Fonte: Adaptado de Dhankar e Hooda (2011).

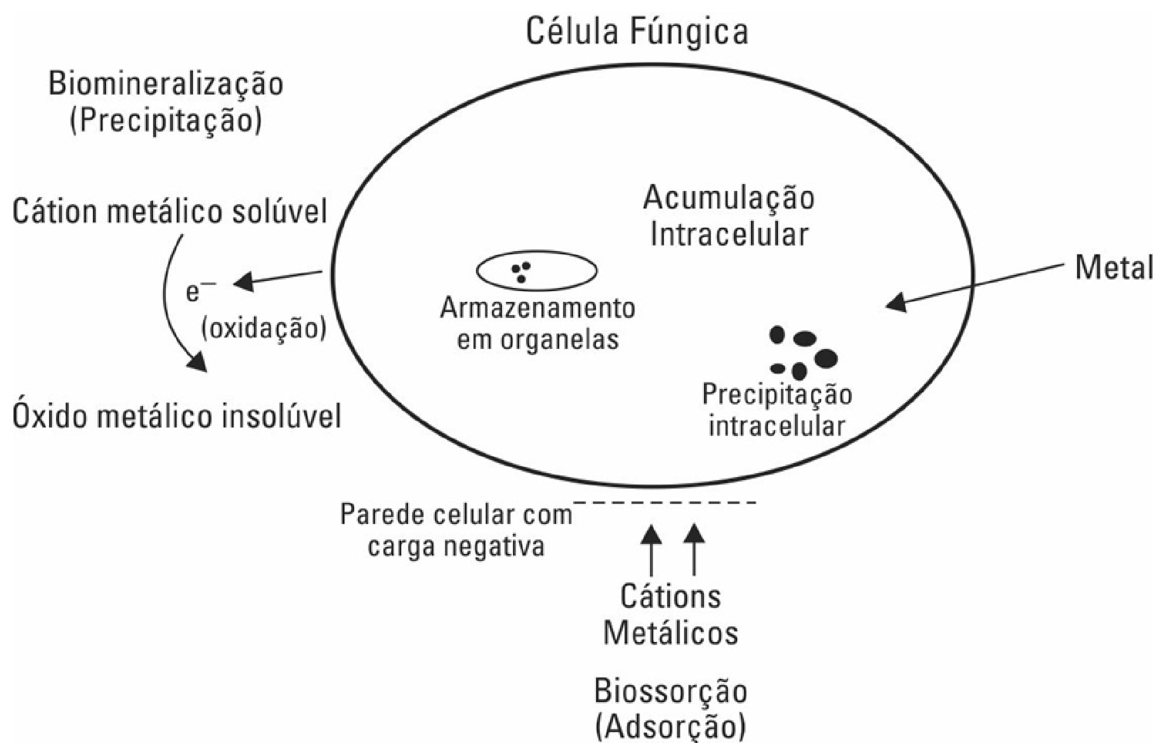


FIGURA 3.7 **Mecanismos de interações dos metais pesados com as células fúngicas em processo de biorremediação.**

A biossorção pode ser definida como a captação de espécies metálicas orgânicas e inorgânicas, tanto solúveis como insolúveis, pela adsorção (Gadd, 2004). O mecanismo ocorre por meio da adsorção passiva do metal pelas células fúngicas, em ambas as células, vivas e mortas, resultando na formação de complexos orgânico-metálicos com os constituintes da parede celular (Gavrilescu, 2004).

A acumulação intracelular de metais representa um mecanismo que requer energia para a captura de cátions metálicos para dentro da célula, onde estão envolvidos processos como permeabilidade e transporte de membrana, sequestro intracelular, armazenamento do metal em organelas e a precipitação intracelular (Gadd, 2004; Gadd, 2010). Por outro lado, a biomineralização consiste tanto na precipitação orgânica formando oxalatos metálicos, quanto na inorgânica com a formação de carbonatos, sulfetos, hidróxidos e óxidos metálicos (Gadd, 2010, 2007).

O emprego adequado dos fungos na biorremediação de diferentes agentes poluentes representa um desafio na área de biotecnologia ambiental. A utilização de ferramentas que garantam reduzidos impactos ambientais pode levar à remediação sustentável do ambiente.

3.5.4. Controle biológico

Controle biológico é um fenômeno natural que consiste na regulação do número populacional de plantas e animais por inimigos naturais, os quais são agentes de mortalidade biótica (Parra *et al.*, 2002). O controle biológico vem sendo considerado uma técnica promissora em ascensão que reúne pesquisadores multidisciplinares. As principais utilizações de agentes no controle biológico são: (1) de invertebrados, (2) de plantas daninhas e (3) de patógenos de plantas. Os fungos se destacam como promissores agentes de controle biológico aplicado ou manipulado.

Os fungos desempenham um papel importante como agentes no controle biológico de pragas devido a sua notória plasticidade em termos de controle de doenças e rendimento de produção (Copping e Menn, 2000). Neste contexto, espécies de *Trichoderma* têm sido o centro de estudos de diversos pesquisadores e são bem conhecidas pelo seu antagonismo contra vários patógenos de solo tais como fungos oportunistas, invertebrados e bactérias (Verma *et al.*, 2007). Da Silva *et al.* (2013) demonstraram que isolados de *Trichoderma* possuem eficiência no controle da mancha-foliar, doença causada pelo fungo fitopatogênico *Pestalotiopsis clavispora*. Outros exemplos são os fungos *Trichoderma viride* e *Aspergillus niger* que apresentam atividade antagonista contra fungos xilófagos (fungos que utilizam os componentes da madeira para se nutrir) quando testadas contra

diferentes tipos de podridão branca causada pelo fungo *Sclerotinia sclerotiorum* e podridão parda causada pelo fungo *Phytophthora palmivora* (Tiwari *et al.*, 2011). Estudos realizados com espécies de *T. harzianum* e *T. virens* mostram que esses fungos são antagonistas dos fungos fitopatogênicos *Penicillium expansum*, *Rhizoctonia solani* e *Fusarium culmorum* (Batta, 2004). Esta atividade antagonista é atribuída, principalmente, a diferentes substâncias antimicrobianas produzidas por estes fungos em conjunto com sua fisiologia de crescimento (Verma *et al.*, 2007).

Entre os fungos utilizados em processos de controle biológico, os entomopatogênicos possuem seu destaque. Este grupo de fungos ataca e infecta insetos podendo levá-los à morte (Singkaravanit *et al.*, 2010) e desempenha um papel vital como agentes no controle biológico de populações de insetos nocivos na agricultura e saúde pública. Existe uma variedade de fungos que infectam insetos de diferentes espécies. A maioria das espécies de fungos que causa doenças em insetos inclui ascomicetos, zigomicetos e basidiomicetos. Os fungos *Beauveria bassiana* e *Metarhizium anisopliae* são os mais estudados e utilizados em programas de controle biológico de insetos. No Brasil, as cigarrinhas-das-pastagens (*Mahanarva posticata* e *M. fimbriolata*) causam grandes perdas na produção de cana. Estudos realizados com o fungo *M. anisopliae* possibilitou a redução de 70-90% dos indivíduos das cigarrinhas. *Metarhizium anisopliae* é capaz de colonizar a mariposa *Diatraea saccharalis*, a principal praga da cana, apresentando considerável diminuição dos seus ovos e larvas (Alves e Lopes, 2008).

Outro exemplo é o controle da doença zoonótica chamada "peste", causada pela bactéria *Yesinia pestis* (uma das bactérias mais patogênicas existentes), a qual ocorre em diferentes formas como bubônica, septicêmica e pneumônica, sendo esta última mais agressiva e quando não tratada de forma rápida e adequada é fatal (Laudisoit *et al.*, 2007). Em termos de saúde pública a peste é um problema em várias partes do mundo, sendo extremamente importante na África, onde ocorre a maioria dos casos (Tikhomirov *et al.*, 1999). Esta peste pode ser transmitida aos seres humanos por pequenos mamíferos, particularmente roedores, por meio de picadas de pulgas (Laudisoit *et al.*, 2007). Mnyone *et al.* (2012) realizaram um estudo preliminar com os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* como agentes de biocontrole da pulga *Xenopsylla brasiliensis*, um dos vetores da peste zoonótica. Os resultados demonstraram que os fungos *M. anisopliae* e *B. bassiana* foram capazes de infectar mais de 90% das larvas da pulga e reduziram significativamente a sobrevivência de todas as larvas. Estas duas espécies de fungos também foram capazes de infectar todos os estágios de vida da pulga *X. brasiliensis.* Estes resultados justificam o potencial de

fungos entomopatogênicos no controle biológico contra insetos vetores de doenças.

Outra doença também muito preocupante globalmente é a causada pelo vírus da Dengue, sendo o vetor primário desta doença o mosquito *Aedes aegypti.* O aumento da resistência de *A. aegypti* a inseticidas limita a eficácia do controle deste vetor, com isso, ferramentas alternativas são urgentemente necessárias (Cui *et al.*, 2006; García *et al.*, 2009). O fungo *B. bassiana* mostrou-se virulento em testes *in vivo* com mosquitos adultos de *A. aegypti*, demonstrando seu potencial como agente de controle biológico indireto da Dengue (Darbro *et al.*, 2011).

Os fungos entomopatogênicos representam um importante componente para utilização em técnicas de manejo integrado de controle de pragas da horticultura, silvicultura e agricultura (Inglis *et al.*, 2000). Apesar da eficácia comprovada no controle de várias espécies de insetos, o uso prático de fungos entomopatogênicos ainda é inexpressivo no mundo e um campo aberto para pesquisa e utilização comercial (Alves e Lopes, 2008).

3.5.5. Alimentos

3.5.5.1. Alimentos fermentados

Os fungos filamentosos são utilizados como culturas iniciadoras em processos fermentativos, bem como fonte de fibras, vitaminas, proteínas ou outros componentes nutritivos (Bourdichon *et al.*, 2012). Espécies do gênero *Aspergillus*, como *A. oryzae* e *A. sojae*, são utilizadas na produção de alimentos tradicionais na Ásia, tais como molho de soja, miso e fermentados de leguminosas usados para realçar o sabor de diferentes alimentos (Caplicec e Fitzgeralda, 1999). *Aspergillus oryzae* e *A. niger* também são utilizados na fermentação do arroz para a produção de saquê e do licor awamori no Japão (Bourdichon *et al.*, 2012). *Aspergillus acidus* é utilizado na fermentação de uma variedade de chás na China (Mogensen *et al.*, 2009). Outro gênero importante em processos fermentativos é o *Rhizopus*. *Rhizopus oligosporus* é a espécie dominante no processo responsável pela fermentação da soja e produção de uma farinha conhecida como Tempeh, originalmente consumida na Indonésia, a qual possui alto valor nutricional (Badu *et al.*, 2009).

De forma análoga à popularidade dos produtos fermentados encontrados na Ásia, podemos citar a produção e consumo de queijo no ocidente. O processo de fabricação de queijo é composto por uma sucessão de bactérias, leveduras e fungos filamentosos, os quais determinam, ao fim do processo, consistência e sabor próprios para cada tipo de queijo. Embora as bactérias

sejam as principais responsáveis pela fermentação lática, os fungos filamentosos também possuem papel importante no processo. Espécies de *Aspergillus* e *Mucor* são produtores de enzimas necessárias à coagulação da proteína do leite, substituindo o uso de enzimas de origem animal (Moore e Chiu, 2001). As enzimas mais utilizadas no processo de coagulação do leite foram por muito tempo a quimosina e pepsina que historicamente eram obtidas somente a partir de parte do estômago de ruminantes. No entanto, com o aumento da produção de queijo, o fornecimento de enzimas coagulantes de origem animal tornou-se insuficiente (Moore e Chiu, 2001). Em 1964 foi publicada a primeira patente nos EUA (Kei e Shinjiro, 1964) sobre o uso de um novo coalho microbiano, composto por enzimas coagulantes (principalmente a renina), obtido a partir de cultura de *Mucor pusillus* e gêneros como *Rhiazopus*, *Monoascus*, *Ascochyta*, *Sclerotium*, *Colletotrichum*, bem como mutantes naturais ou artificiais desses fungos. Na etapa de coagulação são formadas a coalhada (parte sólida resultante da coagulação de proteínas e gorduras que dará origem ao queijo) e o soro do leite (parte líquida formada por cerca de 55% dos nutrientes do leite, a qual é descartada). Posteriormente a esta etapa, espécies de fungos filamentosos participam do processo de maturação de alguns queijos, contribuindo assim para as suas características organolépticas (Ropars *et al.*, 2012).

O processo de amadurecimento de alguns queijos tem sido utilizado por mais de 2 mil anos. Em queijos como Roquefort, Gorgonzola, Stilton, Dinamarquês azul, *Blue* Cheshire, o fungo *Penicillium roquefortii* é inoculado inicialmente na etapa de estocagem do produto em temperatura e umidade controladas. O fungo cresce pelo queijo, produzindo substâncias denominadas metilcetonas, principalmente 2-heptona, que dão origem ao sabor e odor característicos do queijo (Bourdichon *et al.*, 2012). Já os queijos Camemberte e Brie são amadurecidos pelo fungo *Penicillium camembertii*, o qual é responsável por modificar a textura e sabor dos produtos (Moore e Chiu, 2001). O fungo cresce na superfície do queijo, produzindo proteases extracelulares que digerem o centro criando uma consistência mais leve e cremosa em relação à crosta superficial (Moore e Chiu, 2001). Recentemente, alguns autores (Ropars *et al.*, 2012) realizaram um trabalho a partir de 133 isolados de fungos filamentosos obtidos de queijo e culturas iniciais do processo de produção na França. Destes, 106 foram identificados como pertencentes ao gênero *Penicillium*, sendo a maior parte identificada dentro do complexo *P. camemberti*/*P. commune* e *P. roqueforti*. Além dessas espécies, também foram encontradas em menor abundância espécies como *P. paneum* (filogeneticamente próximo de *P. roqueforti*), *P. nalgiovense*, *P. solitum*, *P. crustosum* e *P. nordicum*.

3.5.5.2. Cogumelos comestíveis, medicinais, tóxicos, alucinógenos e venenosos

Cogumelos são as estruturas reprodutivas sexuadas macroscópicas, também conhecidas como corpos de frutificação, de alguns fungos dos filos Ascomycota (ascoma) e Basidiomycota (basidioma). Estes cogumelos são considerados selvagens (pois não são cultivados pelo homem) e são consumidos como alimentos em diversas partes do mundo.

Devido à sua apreciação na culinária, os cogumelos foram "domesticados" e passaram a ser cultivados pelo homem. O primeiro cogumelo cultivado pelo homem foi a *Auricularia auricula*, o que ocorreu na China por volta do ano 600 d. C.; segundo registros históricos, o cultivo e consumo de cogumelos ocorreu também em civilizações antigas como a romana, grega, egípcia e da América Central (Ivors, 2003). Atualmente, os cogumelos são consumidos em diversos países, inclusive no Brasil; o consumo de cogumelos per capita no Brasil atingiu 288 g/ano, o que quando comparado a outros países ainda é considerado muito baixo. Na França o consumo de cogumelos per capita chega a 2 kg/ano (Embrapa, 2016).

Já foram registradas cerca de duas mil espécies de cogumelos selvagens comestíveis e utilizadas como alimentos para o homem, as quais são provenientes de 85 países (Boa, 2004). Cerca de 20 espécies de cogumelos são cultivadas comercialmente, e no Brasil as espécies mais cultivadas para fins comerciais são *Agaricus bisporus* (champignon de Paris), *Pleurotus ostreatus* (cogumelo ostra), *Lentinula edodes* (shiitake) e *Agaricus subrufescens* (Champignon do Brasil, Cogumelo do Sol, Cogumelo Medicinal, "Royal Sun *Agaricus*" ou "The Brazilian Medicinal Mushroom") (Urben *et al.*, 2001). O *Agaricus bisporus* (Champignon de Paris) é a espécie de cogumelo comestível mais cultivada no Brasil e no mundo.

Os cogumelos são considerados alimentos muito nutritivos, pois possuem elevadas quantidades de proteínas, vitaminas, minerais, carboidratos, baixo teor de gorduras e grande quantidade de fibras (Manzi, 1999; Manzi, 2001; Embrapa, 2016). O teor dessas substâncias entre as espécies de cogumelos é variável; determinadas espécies podem conter quantidades de proteínas comparáveis a alimentos como carnes e ovos. Cogumelos comestíveis selvagens na China apresentam diferentes concentrações de carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas e minerais (Barros *et al.*, 2008).

A parede celular dos cogumelos, assim como a parede celular de plantas, pode ser considerada fonte de fibras. Esta parede é composta por polissacarídeos, quitina e compostos fibrilares, os quais são carboidratos

não digeríveis (resistentes às enzimas digestivas), sendo, portanto, considerados fibras dietéticas. Os carboidratos perfazem entre 35% e 70% do peso seco dos cogumelos, sendo que existe uma grande variação da quantidade de fibras dietéticas entre as diferentes espécies de cogumelos. Assim, apesar de serem considerados uma boa fonte de fibras dietéticas, este alimento ainda é pouco utilizado para este fim (Cheung, 2013).

Cogumelos também se apresentam como potenciais fontes de prebióticos, pois contêm carboidratos não solúveis como quitinas, hemicelulose, mananas, xilanas e galactanas não digeríveis capazes de modular a proliferação e atividade da microbiota intestinal (Saad, 2006). Pesquisas iniciais demonstraram efeito prebiótico de *Pleurotus ostreatus* e *Pleurotus eryngii* (Aida, 2009).

Os cogumelos também possuem propriedades antioxidantes, pois são capazes de produzir substâncias tais como terpenos, esteroides e compostos fenólicos a partir do seu metabolismo secundário (Ishikawa *et al.,* 1984; Woldegiorgis *et al.,* 2014), que inibem ou reduzem as lesões causadas pelos radicais livres nas células (Bianchi, 1999). Já foram encontrados cogumelos selvagens e cultivados com propriedades antioxidantes, os quais podem ser utilizados na dieta da população, protegendo-a contra danos oxidativos e doenças originadas pelo estresse oxidativo (Wong, 2009; Ozyurek *et al.,* 2014; Woldegiorgis *et al.,* 2014).

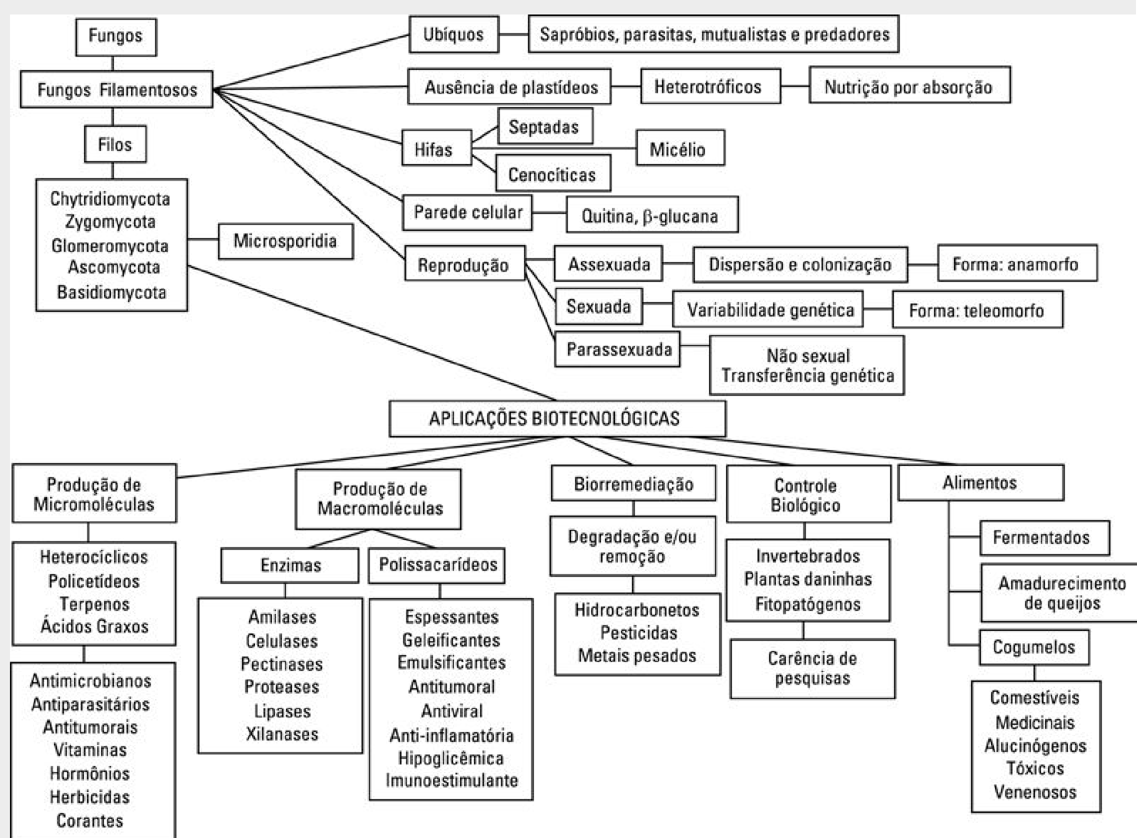
Além de seu longo histórico de utilização na culinária, os cogumelos são há muito tempo utilizados na medicina popular do ocidente e na medicina tradicional do oriente (Roupas *et al.,* 2012). Dentre as poucas pesquisas conduzidas com base no consumo de cogumelos por humanos, as mais promissoras indicam uma relação inversa entre seu consumo e risco de desenvolver câncer de mama (Roupas *et al.,* 2012). Estas pesquisas demostraram também que o efeito do extrato/substâncias de cogumelos possui maior impacto na saúde do que o seu consumo *in natura*.

Experimentos realizados *in vitro* e *in vivo* demonstraram que cogumelos e seus componentes geram muitos benefícios para a saúde, sendo a maioria deles indiretos devido à estimulação ou modulação do sistema imune, o que ocorre devido ao seu conteúdo polissacarídico (presença de β-glucanas ou complexos polissacarídeos-proteínas) (Roupas *et al.,* 2012). O consumo de cogumelos comestíveis também pode afetar certos biomarcadores de risco cardiovascular, já que possui efeito na redução do colesterol e, consequentemente, na prevenção do desenvolvimento de doenças como a aterosclerose (Guillamón *et al.,* 2010).

Além dos cogumelos comestíveis e medicinais, não podemos deixar de destacar a existência dos cogumelos tóxicos, venenosos e alucinógenos, os quais podem até mesmo levar à morte se ingeridos. Apesar de poucas

espécies de cogumelos serem venenosas, tóxicas ou alucinógenas, muitas delas são similares às espécies comestíveis. Assim, não é possível distinguir entre cogumelos comestíveis, tóxicos, venenosos e alucinógenos apenas por sua aparência, sendo necessária sua correta identificação para garantir segurança ao consumidor (Baptista-Ferreira *et al.*, 2013); a identificação das espécies de cogumelos comestíveis deve ser realizada baseada no conhecimento científico e local sobre os mesmos (Boa, 2004).

Esquema dos conceitos apresentados



Questões

1. Como são denominados os tipos de hifas e quais são as diferenças morfológicas que os caracterizam?
2. Existem três tipos de esporos assexuados: os conídios, esporangiósporos e zoósporos. Dentre os filos de fungos

apresentados, identifique qual o tipo de esporo produzido por cada um.
3. Cite e caracterize os cinco principais filos pertencentes ao Reino Fungi.
4. Correlacione as condições climáticas do planeta e a distribuição e diversidade dos fungos filamentosos.
5. As macromoléculas produzidas pelos fungos podem ser utilizadas em processos que vão desde a decomposição/reciclagem até a indústria. Considerando o exposto, cite três enzimas, bem como a espécie do fungo responsável por sua produção e sua aplicação industrial.
6. Qual a característica que os fungos possuem que os faz serem bons alvos para processos de biorremediação?
7. Explique os três principais mecanismos que os fungos utilizam na biorremediação de metais.
8. Quais são as vantagens da utilização de fungos no controle biológico?
9. Exemplifique a importância dos fungos filamentosos na indústria alimentícia, considerando sua participação em diferentes produtos fermentados do oriente e na produção de queijos.
10. Explique por que o consumo de cogumelos como alimentos e produtos medicinais deve ser feito de forma cuidadosa.

Tópicos para discussão

Como os fungos estão inseridos no seu dia-a-dia? Discuta em sala de aula sobre a importância dos mesmos e leve essa discussão para a sua família e círculo de amigos. A sua percepção difere das demais?

Referências

Aidaa FMNA, Shuhaimia M, Yazidb M, Maaruf AG. Mushroom as a potential source of prebiotics: a review. *Trends in Food Science & Technology*. 2009;20:567–575.

Aime MC, Brearley FQ. Tropical fungal diversity: closing the gap between species estimates and species discovery. *Biodiversity and Conservation*. 2012;21:2177–2180.

Alves SB, Lopes RB. *Controle Microbiano de Pragas na América Latina: Avanços e Desafios*. São Paulo: E.D. FAELQ; 2008: 414 p.

Anisimov OA, Vaughan DG, Callaghan TV, Furgal C, Marchant H, Prowse TD, Vaughan DG, Borzenkova I, Forbes D, Hinkel KM, Kobak K, Loeng H, Root T, Shiklomanov N, Sinclair B, Skvarca P, Dahe Q, Walsh JE. Polar regions (Arctic and Antarctic). *Climate change*. 2007;15:653–685.

Aranda E. Promising approaches towards biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons with Ascomycota fungi. *Current Opinion in Biotechnology*. 2016;38:1–8.

Arenz BE, Blanchette RA. Distribution and abundance of soil fungi in Antarctica at sites on the Peninsula, Ross Sea Region and McMurdo Dry Valleys. *Soil Biology and Biochemistry*. 2011;43(2):308–315.

Arnold AE. Diversity and Ecology of Fungal Endophytes in Tropical Forests. In: Deshmukh SK, Rai MK, eds. *Biodiversity of fungi: their role in human life*. Science Publishers; 2005: ISBN: 1578083680.

Atlas RM. Petroleum biodegradation and oil spill bioremediation. *Marine Pollution Bulletin*. 1995;31:178–182.

Augustyniuk-Kram A, Kram KJ. Entomopathogenic Fungi as an Important Natural Regulator of Insect Outbreaks in Forests (Review). In: Blanco JA, Lo YH, eds. *Forest Ecosystems - More than Just Trees*; 2012: ISBN: 978-953-51-0202-1, InTech. doi:10.5772/1127.

Bacon CW, White JF. *Microbial endophytes*. Marcel Dekker Inc; 2000.

Babu PD, Bhakyaraj R, Vidhyalakshmi R. A low cost nutritious food "Tempeh" – a review. *World Journal Dairy Food Sciense*. 2009;4(1):22–27.

Baptista-Ferreira, J.; Silva, A.P.; Vicente, H.P. Guia do Colector de Cogumelos – para os cogumelos silvestres comestíveis com interesse comercial em Portugal. 2013. Direção-Geral de Agricultura e Desenvolvimento Rural. ISBN: 978-989-8539-06-09.

Barros L, Cruz T, Baptista P, Estevinho LM, Ferreira ICFR. Wild and commercial mushrooms as source of nutrients and nutraceuticals. *Food and Chemical Toxicology*. 2008;46(8):2742–2747.

Bashyal B, Li JY, Strobel GA, Hess WM. *Seimatoantlerium nepalense*, an endophytic taxol producing coelomycete from Himalayan yew (*Taxus wallachiana*). *Mycotaxon*. 1999;72:33–42.

Batta YA. Effect of treatment with *Trichoderma harzianum* Rifai formulated in invert emulsion on postharvest decay of apple blue mold. *International Journal of Food Microbiology*. 2004;96:281–288.

Bérdy J. Bioactive Microbial Metabolites. *The Journal of Atibiotics*. 2005;58(1):1–26.

Berrin J-G, Navarro D, Couturier M, Olivé C, Grisel S, Haon M, Taussac S, Lechat C, Courtecuisse R, Favel A, Coutinho PM, Lesage-Meessen L. Exploring the Natural Fungal Biodiversity of Tropical and Temperate Forests toward Improvement of Biomass Conversion. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012;78(18):6483–6490.

Bianchi, Maria De Lourdes Pires; Antunes, Lusânia Maria Greggi. 1999. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. Revista de Nutrição, 12(2): 123-30.

Bills G, Dombrowski A, Pelaez F, Polishook J, An ZQ. Recent and future discoveries of pharmacologically active metabolites from tropical fungi. In: Waltling R, Frankland JC, Ainsworth AM, Issac S, Robinson CH, eds. *Tropical Mycology. Volume 2, Micromycetes*. CABI Publishing; 2002: ISBN: 0851995438.

Bills GF, Christensen M, Powell M, Thorn G. Saprobic soil fungi. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS, eds. *Biodiversity of Fungi - Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press; 2004: ISBN: 978-0-12-509551-8.

Binder M, Justo A, Riley R, Salamov A, Lopez-Giraldez F, Sjokvist E, Copeland A, Foster B, Sun H, Larsson E, Larsson K-H, Townsend J, Grigoriev I, Hibbett D. Phylogenetic and phylogenomic overview of the Polyporales. *Mycologia*. 2013;105(6):1350–1373.

Bjorbækmo MFM, Carlsen T, Brysting A, Vrålstad T, Høiland K, Ugland KI, Geml J, Schumacher TH. High diversity of root associated fungi in both alpine and arctic Dryas octopetala. *BMC Plant Biology*. 2010;10(1):1.

Blackwell M. The Fungi: 1, 2, 3 … 5.1 million species? *American Journal of Botany*. 2011;98(3):426–438.

Blanchette RA, Held BW, Arenz BE, Jurgens JA, Baltes NJ, Duncan SM, Farrell RL. An Antarctic hot spot for fungi at Shackleton's historic hut on Cape Royds. *Microbiology Ecology*. 2010;60(1):29–38.

Boa E. Wild edible fungi a global overview of their use and importance to people. *Food and Agriculture Organization of the United Nations*. 2004;(17).

Bourdichon F, Casaregola S, Farrokh C, Frisvad JC, Gerds ML, Hammes WP, Powell IB. Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use. *International journal of food microbiology*. 2012;154(3):87–97.

Bridge PD, Spooner BM, Roberts PJ. Non-lichenized fungi from the Antarctic region. *Mycotaxon*. 2008;106:485–490.

Brunati M, Rojas JL, Sponga F, Ciciliato I, Losi D, Göttlich E, De Hoog S, Genilloud O, Marinelli F. Diversity and pharmaceutical screening of fungi from benthic

mats of Antarctic lakes. *Marine Genomics*. 2009;2(1):43–50.

Bücking H, Liepold E, Ambilwade P. The Role of the Mycorrhizal Symbiosis in Nutrient Uptake of Plants and the Regulatory Mechanisms Underlying These Transport Processes. In: Dhal NK, Sahu SC, eds. *Plant Science*; 2012: ISBN: 978-953-51-0905-1. InTech. doi:10.5772/52570.

Callan, B.E.; Carris, L.M. 2004. Fungi on living plant substrata, including fruits. Chap. 7 In : Biodiversity of, Fungi, Mueller, G., M., Bills, G.F., Foster, M.S., (eds.), Inventory and Monitoring Methods.

Campos FF, Rosa LH, Cota BB, Caligiorne RB, Rabello ALT, Alves TMA, Rosa CA, Zani CL. Leishmanicidal metabolites from *Cochliobolus* sp., an endophytic fungus isolated from *Piptadenia adiantoides* (*Fabaceae*). *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 2008;2(12).

Cantrell SA, Dianese JC, Fell J, Gunde-Cimerman N, Zalar P. Unusual fungal niches. *Mycologia*. 2001;103(3):1161–1174.

Caplice E, Fitzgerald GF. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 1999;50(1):131–149.

Carballeira NM. New advances in fatty acids as antimalarial, antimycobacterial and antifungal agents - a review. *Progress in Lipid Research*. 2008;47(1):50–61.

Carballeira NM, O'Neill R, Parang K. Racemic and optically active 2-methoxy-4-oxatetradecanoic acids: novel synthetic fatty acids with selective antifungal properties. *Chemistry and Physics of Lipids*. 2005;136:47–54.

Carballeira NM, O'Neill R, Parang K. Synthesis and antifungal properties of α-methoxy and α-hydroxy substituted 4-thiatetradecanoic acids. *Chemistry and Phyics ofs Lipids*. 2007;150:82–88.

Carvalho CR, Gonçalves VN, Pereira CB, Johann S, Galliza IV, Alves TMA, Rabello A, Sobral MEG, Zani CL, Rosa CA, Rosa LH. The diversity, antimicrobial and anticancer activity of endophytic fungi associated with the medicinal plant *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae) from the Brazilian savannah. *Symbiosis*. 2012;57(1):95–107.

Carvalho CR, Vieira MLA, Cantrell CL, Wedge DE, Alves TMA, Zani CL, Pimenta RS, Sales Junior PA, Murta SMF, Romanha AJ, Rosa CA, Rosa LH. Biological activities of ophiobolin K and 6-epi-ophiobolin K produced by the endophytic fungus *Aspergillus calidoustus*. *Natural Product Research*. 2015;30(4):478–481.

Castro AM, Pereira Jr N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*. 2010;33(1):181–188.

Chahinian H, Vanot G, Ibrik A, Rugani N, Sarda L, Comeau LC. Production of Extracellular Lipases by *Penicillium cyclopium* Purification and Characterization of a Partial Acylglycerol Lipase. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2000;64(2):215–222.

Cheung PC. Mini-review on edible mushrooms as source of dietary fiber: preparation and health benefits. *Food Science and Human Wellness*. 2013;2(3):162–

166.

Clay K. Fungal Endophytes of Grasses: A Defensive Mutualism between Plants and Fungi. *Ecology*. 1988;69(1):10–16.

Copping LG, Menn JJ. Biopesticides: a review of their action, applications and efficacy. *Pest Management Science*. 2000;56(8):651–676.

Cota BB, Rosa LH, Caligiorne RB, Rabello ALT, Alves TMA, Rosa CA, Zani CL. Altenusin, a biphenyl isolated from the endophytic fungus *Alternaria* sp., inhibits trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. *FEMS Microbiology Letters*. 2008;285(2):177–182.

Cui F, Raymond M, Qiao CL. Insecticide Resistance in Vector Mosquitoes in China. *Pest Management Science*. 2006;62(11):1013–1022.

Cui JL, Guo TT, Ren ZX, Zhang NS, Wang ML. Diversity and antioxidant activity of culturable endophytic fungi from alpine plants of Rhodiola crenulata, R. angusta, and R. sachalinensis. *PloS one*. 2015;10(3):e0118204.

Da Silva FB, Da Silva FJT, Da Silva F, Leal LV, Poletto I. Isolamento e seleção de fungos antagonistas à *Pestalotiopsis clavispora*, patógeno da nogueira-pecã. *Revista Brasileira de Agroecologia*. 2013;8(3):109–118.

Darbro JM, Graham RI, Kay BH, Ryan PA, Thomas MB. Evaluation of entomopathogenic fungi as potential biological control agents of the dengue mosquito, *Aedes aegypti* (Diptera: *Culicidae*). *Biocontrol science and technology*. 2011;21(9):1027–1047.

De Hoog GS, Gottlich E, Platas G, Genilloud O, Leotta G, Van Brummelen J. Evolution, taxonomy and ecology of the genus *Thelebolus* in Antarctica. *Studies in Mycology*. 2005;51:33–76.

Demain AL. Industrial microbiology. *Science*. 1981;214:987–994.

Dhankhar R, Hooda A. Fungal biosorption – an alternative to meet the challenges of heavy metal pollution in aqueous solutions. *Environmental Technology*. 2011;32(5):467–491.

Elster J, Delmas RJ, Petit JR, Reháková K. Composition of microbial communities in aerosol, snow and ice samples from remote glaciated areas (Antarctica, Alps, Andes). *Biogeosciences Discussions*. 2007;4(3):1779–1813.

EMBRAPA: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Segurança alimentar, nutrição e saúde: Produção vegetal Agricultura familiar. Disponível em: https://www.embrapa.br/buscadenoticias/noticia/2657298/embrapaabreinscricoesparao47cursosobrecultivodecogumeloscomestiveisemedicinais. Acesso em 27 de julho de 2016.

Fariña JI, Siñeriz F, Molina OE, Perotti NI. High scleroglucan production by *Sclerotium rolfsii*: Influence of medium composition. *Biotechnology Letters*. 1998;20(9):825–831.

Fujiyoshi M, Yoshitake S, Watanabe K, Murota K, Tsuchiya Y, Uchida M, Nakatsubo T. Successional changes in ectomycorrhizal fungi associated with the

polar willow Salix polaris in a deglaciated area in the High Arctic, Svalbard. *Polar Biology*. 2011;34(5):667–673.

Fukasawa Y, Osono T, Takeda H. Wood decomposing abilities of diverse lignicolous fungi on nondecayed and decayed beech wood. *Mycologia*. 2011;103(3):474–482.

Gadd GM. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*. 2004;122(2-4):109–119.

Gadd GM. Geomycology: biogeochemical transformations of rocks, minerals, metals and radionuclides by fungi, bioweathering and bioremediation. *Mycological Research*. 2007;111:3–49.

Gadd GM. Metals, minerals and microbes: geomicrobiology and bioremediation. *Microbiology*. 2010;156:609–643.

García GP, Flores AE, Fernandez-Salas I, Saaveda-Rodriguez K, Reyes-Solis G, Lozano-Fuentes S, Bond JG, Casas-Martinez M, Ramsey JM, García-Rejón J, Dominguez-Galera M, Ranson H, Hemingway J, Eisen L, Black WC. Recent Rapid Rise of a Permethrin Knock Down Resistance Allele in *Aedes aegypti* in México. Public Library of Science Neglected Tropical Diseases. *PLoS biology*. 2009;3(10):1–10.

Gavrilescu M. Removal of Heavy Metals from the Environment by Biosorption. *Engineering in Life Sciences*. 2004;4:219–232.

Godinho VM, Furbino LE, Santiago IF, Pellizzari FM, Yokoya NS, Pupo D, Alves TMA, Junior PAS, Romanha AJ, Zani CL, Cantrell CL, Rosa CA, Rosa LH. Diversity and bioprospecting of fungal communities associated with endemic and cold-adapted macroalgae in Antarctica. *The ISME journal*. 2013;7(7):1434–1451.

Gonçalves VN, Vaz ABM, Rosa CA, Rosa LH. Diversity and distribution of fungal communities in lakes of Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*. 2012;82(2):459–471.

Gopinath SCB, Anbu P, Hilda A. Extracellular enzymatic activity profiles in fungi isolated from oil-rich environments. *Mycoscience*. 2005;46(2):119–126.

Grabherr G, Gottfried M, Pauli H. GLORIA: a global observation research initiative in alpine environments. *Mountain Research and Development*. 2000;20(2):190–191.

Guillamón E, García-Lafuente A, Lozano M, Rostagno MA, Villares A, Martínez JA. Edible mushrooms: role in the prevention of cardiovascular diseases. *Fitoterapia*. 2010;81(7):715–723.

Guimarães LHS, Peixoto-Nogueira SC, Michelin M, Rizzatti ACS, Sandrim VC, Zanoelo FF, Aquino ACMM, Junior AB, Polizeli MLTM. Screening of filamentous fungi for production of enzymes of biotechnological interest. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2006;37:474–480.

Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B. Microbial α-amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*. 2003;00:1–18.

Hassan N, Rafiq M, Hayat M, Shah AA, Hasan F. Psychrophilic and psychrotrophic fungi: a comprehensive review. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2016;15(2):147–172.

Hawksworth DL. The fungal dimension of biodiversity: Magnitude, significance, and conservation. *Mycological Research*. 1991;95(6):641–655.

Hawksworth DL. The magnitude of fungal diversity: the 1.5 million species estimate revisited. *Mycological Research*. 2001;105(12):1422–1432.

Herrgård S, Gibas CJ, Subramaniam S. Role of an Electrostatic Network of Residues in the Enzymatic Action of the *Rhizomucor miehei* Lipase Family. *Biochemistry*. 2000;39:2921–2930.

Hodgson S, Cates C, Hodgson J, Morley NJ, Sutton BC, Gange AC. Vertical transmission of fungal endophytes is widespread in forbs. *Ecology and Evolution*. 2014;4(8):1199–1208.

Hopwood DA, Sherman DH. Molecular genetics of polyketides and its comparison to fatty acid biosynthesis. *Annual review of genetics*. 1990;24(1):37–62.

Hoshino T, Matsumoto N. Cryophilic fungi to denote fungi in the cryosphere. *Fungal Biology Review*. 2012;26(2):102–105.

Idid, M.R.; Krishna, A.; Smykla, J.; Alias, S.A. 2014. Isolamento de microfungos do Ártico e da Antártida solos e sua identificação usando sequências ITS, LSU e SSU. In: Congresso Arctic Biodiversidade, 02-04 dezembro 2014, Trondheim, Noruega.

Inglis GD, Ivie TJ, Duke GM, Goettel MS. Influence of rain and conidial formulation on persistence of *Beauveria bassiana* on potato leaves and Colorado potato beetle larvae. *Biological Control*. 2000;18(1):55–64.

Ishikawa Y, Morimoto K, Hamasaki T. Flavoglaucin, a metabolite of *Eurotium chevalieri*, its antioxidation and synergism with tocopherol. *Journal of American Oil Chemists' Society*. 1984;61(12):1864–1868.

Ivors K. Tracing the Roots of Mushroom Cultivation. Mycena News. *Mycological Society of San Francisco*. 2003;54(4):2–3.

Jacobsen T, Poulsen OM. Comparison of lipases from different strains of the fungus *Geotrichum candidum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism*. 1995;1257(2):96–102.

Katz L, Baltz RH. Natural product discovery: past, present, and future. *Journal of industrial microbiology & biotechnology*. 2016;43(2–3):155–176.

Kei, A.; Shinjiro, I. 1964. U.S. Patent No. 3,151,039. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.

Kjøller A, Struwe S. Microfungi in ecosystems: fungal occurrence and activity in litter and soil. *Oikos*. 1982;39(3):389–422.

Kirk PM, Cannon PF, Minter DW, Stalpers JA. *Taxonomy. Dictionary of the Fungi*. 10th ed. Netherlands: CABI; 2008.

Knight K, Pimentel MCB, Morais MMC, Ledingham WM, Lima Filho JL, Maia MMD. Immobilization of lipase from Fusarium Solani FS1. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2000;31:220–222.

Kochkina G, Ivanushkina N, Ozerskaya S, Chigineva N, Vasilenko O, Firsov S, Spirina E, Gilichinsky D, Gilichinsky D. Ancient fungi in Antarctic permafrost environments. *FEMS microbiology ecology*. 2012;82(2):501–509.

Körner Ch, Paulsen J. A world-wide study of high altitude treeline temperatures. *Journal of Biogeography*. 2004;31(5):713–732.

Kües U. Fungal enzymes for environmental management. *Current Opinion in Biotechnology*. 2015;33:268–278.

Kumar P, Satyanarayana T. Microbial glucoamylases: characteristics and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2009;29(3):225–255.

Laudisoit A, Leirs H, Makundi RH, Van Dongen S, Davis S, Neerinckx S, Deckers J, Libois R. Plague and the human flea, Tanzania. *Emerging Infectious Diseases*. 2007;13(5):687–693.

Lemos JLS, Carlos MC, Farias YPMM, Santos RLC. *Revisão acerca da utilização de microrganismos na biorremediação de rejeitos industriais contendo metais pesados*. Série Tecnologia Ambiental: CETEM/MCT; 2008.

Liu J, Zhang Y, Qiu Lh, Yang F, Ye L, Xia Y. Kinetic resolution of ketoprofen ester catalyzed by lipase from a mutant of CBS 5791. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2004;31(11):495–499.

Liu K, Ding X, Deng B, Chen W. Isolation and characterization of endophytic taxol producing fungi from *Taxus chinensis*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2009;36:1171–1177.

Lydolph MC, Jacobsen J, Arctander P, Thomas M, Gilbert P, Gilichinsky DA, Hansen AJ, Willerslev E, Lange L. Beringian paleocology inferred from permafrost-preserved fungal DNA. *Applied Environmental Microbiology*. 2005;71(2):1012–1017.

Macedo GA, Lozano MMS, Pastore GM. Enzymatic synthesis of short chain citronellyl esters by a new lipase from Rhizopus sp. *Electronic Journal of Biotechnology*. 2003;6(1):3–4.

Madigan M, Martinko J, Dunlap P, Clark D. *Microbiologia De Brock*. 12ª ed Porto Alegre: Editora Artmed; 2010: 1160p.

Manzi P, Aguzzi A, Pizzoferrato L. Nutritional value of mushrooms widely consumed in Italy. *Food Chemistry*. 2001;73(3):321–325.

Manzi P, Gambelli L, Marconi S, Vivanti V, Pizzoferrato L. Nutrients in edible mushrooms: an inter-species comparative study. *Food chemistry*. 1999;65(4):477–482.

Maqbool Z, Sabir Hussain S, Imran M, Mahmood F, Shahzad T, Ahmed Z, Azeem F, Muzammil S. Perspectives of using fungi as bioresource for bioremediation of pesticides in the environment: a critical review. *Environmental Science and Pollution Research*. 2016.

Margesin R, Miteva V. Diversity and ecology of psychrophilic microorganisms. *Research Microbiology*. 2011;162(3):346–361.

Martínková L, Kotik M, Marková E, Homolka L. Biodegradation of phenolic compounds by Basidiomycota and its phenol oxidases: A review. *Chemosphere*. 2016;149:373–382.

Meltofte H, Barry T, Berteaux D, Bültmann H, Christiansen JS, Cook JA, Friðriksson F. Arctic Biodiversity Assesment. Synthesis. *Conservation of Arctic Flora and Fauna (CAFF)*. 2013:355–371.

Mnyone LL, Nghabi KR, Mazigo HD, Katakweba AA, Lyimo IN. Entomopathogenic fungi, *Metarhizium anisopliae* and *Beauveria bassiana* reduce the survival of *Xenopsylla brasiliensis* larvae (Siphonaptera: Pulicidae). *Parasites & vectors*. 2012;5(1):1.

Mogensen JM, Varga J, Thrane U, Frisvad JC. Aspergillus acidus from Puerh tea and black tea does not produce ochratoxin A and fumonisin B 2. *International journal of food microbiology*. 2009;132(2):141–144.

Moore D, Chiu SW. *Fungal products as food. Bio-exploitation of filamentous fungi*. Hong Kong: Fungal Diversity Press; 2001: 223-51.

Morton JB, Koske RE, Stürmer SL, Bentivenga SP. Mutualistic arbuscular endomycorrhizal fungi. In: Mueller GM, Bills GF, Foster MS, eds. *Biodiversity of Fungi - Inventory and Monitoring Methods*. Elsevier Academic Press; 2004: ISBN: 978-0-12-509551-8.

Mundra S, Halvorsen R, Kauserud H, Bahram M, Tedersoo L, Elberling B, Cooper EJ, Eidesen PB. Ectomycorrhizal and saprotrophic fungi respond differently to long-term experimentally increased snow depth in the High Arctic. *Microbiology Open*. 2016:1–14.

Nair DN, Padmavathy S. Impact of endophytic microorganisms on plants, environment and humans. *The Scientific World Journal*. 2014:1–11.

Namboodiri VMH, Chattopadhyaya R. Purification and biochemical characterization of a novel thermostable lipase from *Aspergillus niger*. *Lipids*. 2000;35(5):495–502.

Nguyen QD, Bujna E, Styevkó G, Rezessy-Szabó JM, Hoschke A. Fungal biomolecules for the food industry. In: Gupta VK, Mach RL, Screenivasaprasad S, eds. *Fungal Biomolecules: Sources Applications and Recent Developments*. Wiley Blackwell; 2015: ISBN: 978-1-118-95829-2.

Onofri S, Selbmann L, Zucconi L, Tosi S, De Hoog GS. The mycota of continental Antarctica. *Terra Antarctica Reports*. 2005;11:37–42.

Özyürek M, Bener M, Güçlü K, Apak R. Antioxidant/antiradical properties of microwave-assisted extracts of three wild edible mushrooms. *Food chemistry*. 2014;157:323–331.

Pandey A, Nigam P, Soccol CR, Soccol VT, Singh D, Mohan R. Advances in microbial amylases. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2000;31:135–152.

Parra, J.R.P.; Botelho, P.S.M.; Corrêa, F. S.; Bento, J.M.S. Controle Biológico: Terminologia. 143-164. 2002. In: Parra, J. R.; Botelho, P.S.M.; Corrêa, F.S.; Bento, J.M.S. Controle Biológico no Brasil, Parasitoides e Predadores. São Paulo: Manole, 635 p.

Peay KG, Baraloto C, Fine PVA. Strong coupling of plant and fungal community structure across western Amazonian rainforests. *The ISME Journal*. 2013;7:1852–1861.

Pohl CH, Kock JLF, Thibane VS. Antifungal free fatty acids: A Review Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances. *Méndez-Vilas*. 2011:61–71.

Price PB. A habitat for psychrophiles in deep Antarctic ice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(3):1247–1251.

Qadri M, Rajput R, Abdin MZ, Vishwakarma RA, Riyaz-Ul-Hassan S. Diversity, molecular phylogeny, and bioactive potential of fungal endophytes associated with the himalayan blue pine (*Pinus wallichiana*). *Microbial Ecology*. 2014;67(4):877–887.

Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1998;62(3):597–635.

Rao S, Chan Y, Lacap DC, Hyde KD, Pointing SB, Farrel RL. Low-diversity fungal assemblage in an Antarctic Dry Valleys soil. *Polar Biology*. 2012;35(4):567–574.

Robador A, Brüchert V, Jorgensen BB. The impact of temperature change on the activity and community composition of sulfate-reducing bacteria in arctic versus temperate marine sediments. *Environmental Microbiology*. 2009;11:1692–1703.

Robinson CH. A Cold adaptation in Arctic and Antarctic fungi. *New Phytologist*. 2001;151(2):341–353.

Rodriguez RJ, White JR JF, Arnold AE, Redman RS. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist*. 2009;182(2):314–330.

Ropars J, Cruaud C, Lacoste S, Dupont J. A taxonomic and ecological overview of cheese fungi. *International journal of food microbiology*. 2012;155(3):199–210.

Rosa LH, Almeida Vieira MDL, Santiago IF, Rosa CA. Endophytic fungi community associated with the dicotyledonous plant *Colobanthus quitensis* (Kunth) Bartl (Caryophyllaceae) in Antarctica. *FEMS Microbiology Ecology*. 2010;73(1):178–189.

Rosa LH, Vieira MLA, Cota BB, Johann S, Alves TMA, Zani CL, Rosa CA. Endophytic fungi of tropical forests: a promising source of bioactive prototype molecules for the treatment of neglected diseases. In: Ekinci D, ed. *Drug Development - A Case Study Based Insight into Modern Strategies*. Intech; 2011: ISBN: 9789533072579.

Roupas P, Keogh J, Noakes M, Margetts C, Taylor P. The role of edible mushrooms in health: Evaluation of the evidence. *Journal of Functional Foods*. 2012;4(4):687–

709.
Ruisi S, Barreca D, Selbmann L, Zucconi L, Onofri S. Fungi in Antarctica. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*. 2007;6(1–3):127–141.
Saad SMI. Probiotics and prebiotics: the state of the art. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 2006;42(1):1–16.
Saggin Júnior, O.J.; Silva, E.M.R. 2006. Micorriza Arbuscular – Papel, Funcionamento e Aplicação da Simbiose. Embrapa. Miolo_Biota.pmd., 101-50.
Schnürer J, Clarholm M, Rosswall T. Microbial biomass and activity in an agricultural soil with different organic matter contents. *Soil Biology and Biochemistry*. 1985;17(5):611–618.
Selbmann L, De Hoog GS, Mazzaglia A, Friedmann EI, Onofri S. Fungi at the edge of life: cryptoendolithic black fungi from Antarctic desert. *Study Mycololy*. 2005;51:1–32.
Selbmann L, Isola D, Egidi E, Zucconi L, Gueidan C, de Hoog GS, Onofri S. Mountain tips as reservoirs for new rock-fungal entities: Saxomyces gen. nov. and four new species from the Alps. *Fungal Diversity*. 2014;65(1):167–182.
Selbmann L, Stingele F, Petruccioli M. Exopolysaccharide production by filamentous fungi: the example of *Botryosphaeria rhodina*. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2003;84(2):135–145.
Shivaji, S.; Prasad, G.S. 2009. Antarctic yeasts: biodiversity and potential applications. In: Yeast biotechnology: Diversity and applications. Netherlands: E.D. Springer, p. 3-18.
Shraddha, R.; Shekher, S.; Sehgal, S.; Kamthania, K.; Kumar, A. 2011. Laccase: microbial sources, production, purification, and potential biotechnological applications. Enzyme Research, ID 217861.
Silva MLC, Martinez PF, Izeli NL, Silva IR, Vasconcelos AFD, Cardoso MS, Stelutti RM, Giese EC, Barbosa AM. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. *Química Nova*. 2006;29(1):85–92.
Singh AK, Mukhopadhyay M. Overview of fungal lipase: a review. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2012;166:486–520.
Singh H. *Mycoremediation: Fungal Bioremediation*. New Jersey: John Wiley & Sons; 2006.
Singkaravanit S, Kinoshita H, Ihara F, Nihira T. Cloning and functional analysis of the second geranylgeranyl diphosphate synthase gene influencing helvolic acid biosynthesis in *Metarhizium anisopliae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010;87(3):1077–1088.
Souza PM, Bittencourt MLA, Caprara CC, Freitas M, Almeida RPC, Silveira D, Fonseca YM, Filho EXF, Pessoa Junior A, Magalhães PO. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2015;46(2):337–346.
Stierle A, Strobel G, Stierle D, Grothaus P, Bignami G. The search for a taxol-producing microorganism among the endophytic fungi of the Pacific yew, *Taxus*

brevifolia. *Journal of Natural Products*. 1995;58:1315–1324.

Suryanarayanan TS, Murali TS, Venkatesan G. Ocurrence and istribution of fungal endophytes in tropical across a rainfall gradient. *Canadian Journal of Botany*. 2002;80(8):818–826.

Tan RX, Zou WX. Endophytes: a rich source of functional metabolites. *Natural Product Reports*. 2001;18(4):448–459.

Tikhomirov, E.; Gage, K.L.; Gratz, N.; Poland, J.D.; Tikhomirov, E. 1999. Epidemiology and distribution of plague. In: Plague manual: epidemiology, distribution, surveillance and control. E.D. OMS, p. 11-41.

Tiwari CK, Parihar J, Verma RK. Potential of *Aspergillus niger* and *Trichoderma viride* as biocontrol agents of wood decay fungi. *Journal of the Indian Academy of Wood Science*. 2011;8(2):169–172.

Toida J, Arikawa Y, Kondou K, Fukuzawa M, Sekiguchi J. Purification and Characterization of Triacylglycerol Lipase from *Aspergillus oryzae*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 1998;62(4):759–763.

Urben AF, Oliviera HCB, Vieira W, Correia MJ, Uriartt AH. *Produção de cogumelos por meio de tecnologia chinesa modificada*. Brasília: Embrapa; 2001: 151 p.

Vasconcelos AFD, Monteiro NK, Dekkerc RFH, Barbosa AM, Carbonero ER, Silveira JLM, Sassakie GL, Silva R, Silva MLC. Three exopolysaccharides of the β-(1→6)-D-glucan type and a β-(1→3;1→6)-D-glucan produced by strains of *Botryosphaeria rhodina* isolated from rotting tropical fruit. *Carbohydrate Research*. 2008;343(14):2481–2485.

Verma M, Brar SK, Tyagi RD, Surampalli RY, Valero JR. Antagonistic fungi, *Trichoderma spp*.: panoply of biological control. *Biochemical Engineering Journal*. 2007;37(1):1–20.

Viswanath MB, Chandra S, Pallavi H, Rajasekhar RB. Screening and assessment of laccase producing fungi isolated from different environmental samples. *African Journal of Biotechnology*. 2008;7(8):1129–1133.

Voříšková J, Brabcová V, Cajthaml T, Baldrian P. Seasonal dynamics of fungal communities in a temperate oak forest soil. *New Phytologist*. 2014;201(1):269–278.

Wang J, Li G, Lu H, Zheng Z, Huang Y, Su W. Taxol from *Tubercularia* sp. strain TF5, an endophytic fungus of *Taxus mairei*. *FEMS Microbiology Letters*. 2000;193(2):249–253.

Wang JB, Leger St RJ, Wang C. Advances in Genomics of Entomopathogenic Fungi. In: Lovett B, Leger RJSt, eds. *Genetics and Molecular Biology of Entomopathogenic Fungi*. Elsevier Inc; 2016: ISBN: 978-0-12-804694-4.

Ward OP. Production of recombinant proteins by filamentous fungi. *Biotechnology Advances*. 2012;30(5):1119–1139.

Wright DP, Read DJ, Scholes JD. Mycorrhizal sink strength influences whole plant carbon balance of *Trifolium repens* L. Plant. *Cell & Environment*. 1998;21(9):881–891.

Woldegiorgis AZ, Abate D, Haki GD, Ziegler GR. Antioxidant property of edible mushrooms collected from Ethiopia. *Food Chemistry*. 2014;157:30–36.

Wong JY, Chye FY. Antioxidant properties of selected tropical wild edible mushrooms. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2009;22(4):269–277.

Xue J, Yu Y, Bai Y, Wang L, Wu Y. Marine Oil-Degrading Microorganisms and Biodegradation Process of Petroleum Hydrocarbon in Marine Environments: A Review. *Current Microbiology*. 2015;71:220–228.

Yumoto I, Nakamura A, Iwata H, Kojima K, Kusumoto K, Nodasaka Y, Matsuyama H. A novel, facultatively psychrophilic alkaliphile that grows on hydrocarbons. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2002;52:85–90.

Zhang L, Zhang M, Zhou Q, Chen J, Zeng F. Solution Properties of Antitumor Sulfated Derivative of α-(1→3)-D-Glucan from *Ganoderma lucidum*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2000;64(10):2172–2178.

Zhang T, Xiang HB, Zhang YQ, Liu HY, Wei YZ, Zhao LX, Yu LY. Molecular analysis of fungal diversity associated with three bryophyte species in the Fildes Region, King George Island, maritime Antarctica. *Extremophiles*. 2013;17(5):757–765.

Zhong, J. J., Xiao, J.H. 2009. Secondary metabolites from higher fungi: discovery, bioactivity, and bioproduction. In: Biotechnology in China I. Springer Berlin Heidelberg, p. 79-150.

Zinger L, Shahnavaz B, Baptist F, Geremia RA, Choler P. Microbial diversity in alpine tundra soils correlates with snow cover dynamics. *The ISME journal*. 2009;3(7):850–859.

CAPÍTULO 4

Biologia e Biotecnologia de Leveduras

Camila Gontijo de Morais

Marco Aurélio Soares

Mariana Rocha Lopes

Carlos Augusto Rosa

Conceitos apresentados neste capítulo

As leveduras são micro-organismos de grande importância biotecnológica. Estes fungos são conhecidos pela capacidade de realizar fermentações alcoólicas, exercendo um papel fundamental na produção industrial de bioetanol e de diversas bebidas, tais como cerveja, vinho, sidra, saquê e bebidas destiladas. Além destes produtos, estes micro-organismos são utilizados em processos de panificação, produção de queijos, salsichas, entre outros. Também estão presentes em processos industriais que envolvem a produção de enzimas, lipídeos, carotenoides, compostos aromáticos e proteínas heterólogas. Na agricultura, as leveduras têm sido utilizadas como agentes de controle biológico principalmente para evitar a deterioração de frutas. As leveduras são também utilizadas como organismos modelo para o estudo dos eucariotos, principalmente os processos de diferenciação celular. Por tudo isso, as leveduras superam, na capacidade de produção e receitas econômicas geradas, qualquer outro micro-organismo industrial em todo o mundo, e uma espécie, o *Saccharomyces cerevisiae*, é considerada “domesticada”, pois está presente em praticamente todos os processos que envolvem fermentação alcoólica conduzidos pelo homem. O objetivo deste capítulo é dar uma breve visão da classificação e ecologia das

leveduras e descrever alguns processos nos quais estes micro-organismos são utilizados.

4.1. Definição e classificação das leveduras

As leveduras podem ser definidas como fungos unicelulares que se reproduzem predominantemente de maneira assexuada, por brotamento ou fissão (Figura 4.1). No brotamento, ocorre uma evaginação em algum ponto sobre a superfície da célula. O broto aumenta gradualmente de tamanho e posteriormente se separa da célula parental. Na reprodução por fissão, a célula mãe se alonga e ocorre o surgimento de um septo, que cresce a partir da parede celular e divide a célula em duas. Diferentemente dos fungos filamentosos, que se reproduzem sexuadamente, as leveduras não formam seus esporos dentro ou sobre um corpo de frutificação (Kurtzman *et al.*, 2011).

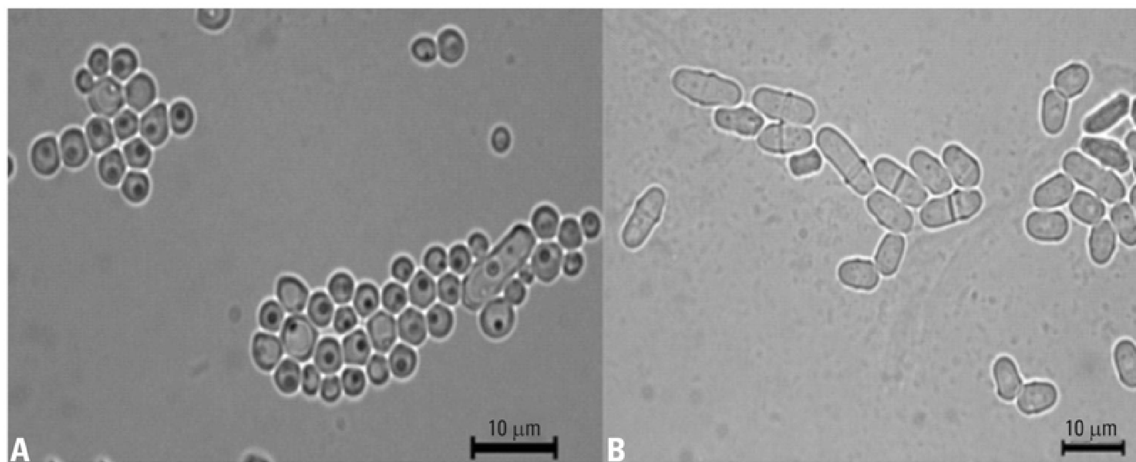


FIGURA 4.1 Morfologia microscópica de leveduras. A. Células de leveduras mostrando a formação de brotos, forma de reprodução assexuada. B. Reprodução assexuada por fissão binária por *Schizosaccharomyces pombe.*

As leveduras estão distribuídas em dois grandes grupos: Ascomicetos e Basidiomicetos. Nas leveduras ascomicéticas, os esporos são formados dentro de uma estrutura fechada, denominada "asca" (Figura 4.2). Nesse processo, duas células haploides se fundem formando uma célula diploide, que posteriormente sofre meiose, originando ascósporos haploides. Nas leveduras basidiomicéticas, os esporos sexuais são produzidos na extremidade de uma estrutura claviforme, denominada basídia. Nessas leveduras, após a formação da hifa dicariótica, ocorre a formação de um

probasídio, que é uma região grande, rica em lipídeos e com parede celular espessa, onde ocorre a cariogamia. Depois da meiose, os núcleos migram para um broto formado na lateral de cada célula basidial. A esporulação geralmente é induzida por condições que limitam o crescimento das leveduras de maneira assexuada, embora algumas possam esporular também em meios ricos e alguns gêneros requerem meios específicos. A temperatura também é um fator importante, sendo que a maior parte das leveduras consegue formar esporos em temperaturas variando de 15 a 25°C. A esporulação pode acontecer rapidamente, em 24-48 horas, ou requerer um tempo maior, de seis semanas ou mais. As leveduras podem ser ainda classificadas como homotálicas ou heterotálicas. Nas homotálicas, o cruzamento ocorre entre a célula parental e o broto; e nas heterotálicas, o cruzamento acontece entre duas linhagens com diferentes tipos sexuais. Os esporos formados variam em número, morfologia, ornamentação e cores, de acordo com as espécies (Kurtzman *et al.*, 2011).

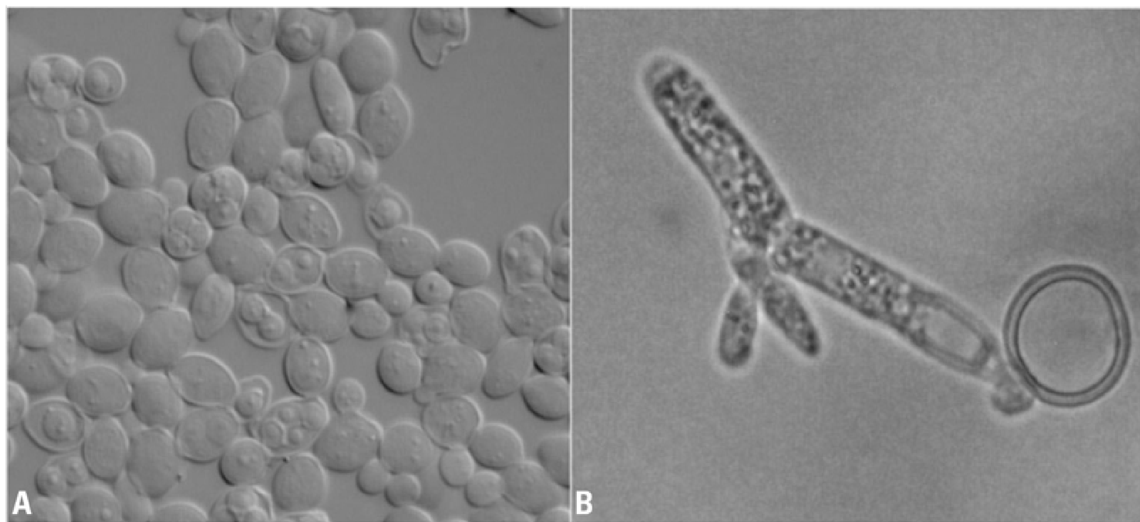


FIGURA 4.2 Esporos sexuais de leveduras. A: ascas e ascósporos (2 a 4 ascósporos no interior das ascas) de *Saccharomyces cerevisiae;* B: Basidiósporos (pequenas células laterais) de *Leucosporidium* spp. *Fonte*: Foto A: Cortesia de José Paulo Sampaio. Foto B: Cortesia de Virginia de Garcia.

A identificação das leveduras é baseada inicialmente nas características fenotípicas, ou seja, a morfologia das colônias e das células, e da capacidade de assimilar diferentes compostos de carbono e nitrogênio e de fermentar diferentes açúcares (Kurtzman *et al.*, 2011). As colônias podem ser descritas de acordo com a textura (mucoide, butirosa, pulverulenta, quebradiça, etc.),

cor (branca, vermelha, salmão, negra ou creme), superfície (lisa, rugosa ou filamentosa), topologia (plana, convexa, irregular, etc.) e forma de suas margens (inteira, irregular ou filamentosa) (Figura 4.3). A morfologia celular é caracterizada quanto à forma (oval, alongada, cilíndrica, apiculada, em forma de meia lua, etc.), o tamanho das células e a presença de pseudifas ou hifas verdadeiras. As espécies, cuja reprodução sexuada é conhecida são denominadas teleomórficas, e dentre estas pode-se citar aquelas pertencentes aos gêneros *Saccharomyces, Hanseniaspora, Pichia, Scheffersomyces, Schizosaccharomyces, Debaryomyces, Starmerella, Yarrowia*, entre outras. As leveduras que não têm a reprodução sexuada conhecida eram classificadas como pertencentes a gêneros denominados anamórficos, como *Candida*, *Cryptococcus* e *Rhodotorula* (Daniel *et al.*, 2014; Kurtzman, 2014). No entanto, baseado em estudos de sequenciamento de regiões do DNA, foi observado que estas leveduras representavam um agrupamento artificial, já que pertenciam filogeneticamente a diferentes gêneros. Por exemplo, o gênero *Candida* tem espécies pertencentes a mais de 30 gêneros diferentes de leveduras com reprodução sexuada conhecida. No entanto, era uma norma taxonômica que estas espécies, mesmo sabendo-se, por estudos de sequências do DNA, que pertenciam a determinados gêneros teleomórficos, deveriam ser classificadas como *Candida*, caso fossem ascomicéticas e tivessem reprodução assexuada por brotamento multipolar (formação do broto em diferentes regiões da célula-mãe). O gênero *Rhodotorula,* por exemplo, foi inicialmente delineado pela cor vermelha característica das colônias, embora posteriormente espécies que formam colônias brancas e cremes tenham sido adicionadas ao gênero (Kurtzman e Fell, 2006). A partir de 2011, o novo código de taxonomia para fungos determina que todas as espécies, independente da descrição do ciclo sexuado, devem ser classificadas em um único gênero, definido por critérios moleculares, baseado em análises filogenéticas. Com isto, o gênero *Candida*, que possuía mais de 300 espécies descritas (Kurtzman *et al.*, 2011), deverá ficar restrito a pouco mais de 20 espécies, formado por leveduras próximas filogeneticamente de *Candida albicans* e *Candida tropicalis*. Todas as outras espécies deverão ser transferidas para os respectivos gêneros em que se encaixarem após os estudos filogenéticos. O mesmo aconteceu com as espécies dos gêneros *Cryptococcus* e *Rhodotorula*, que foram reclassificados em diversos novos gêneros por Liu *et al.* (2015). O gênero *Cryptococcus*, por exemplo, ficou restrito a 10 espécies filogeneticamente próximas de *Cryptococcus neoformans*.

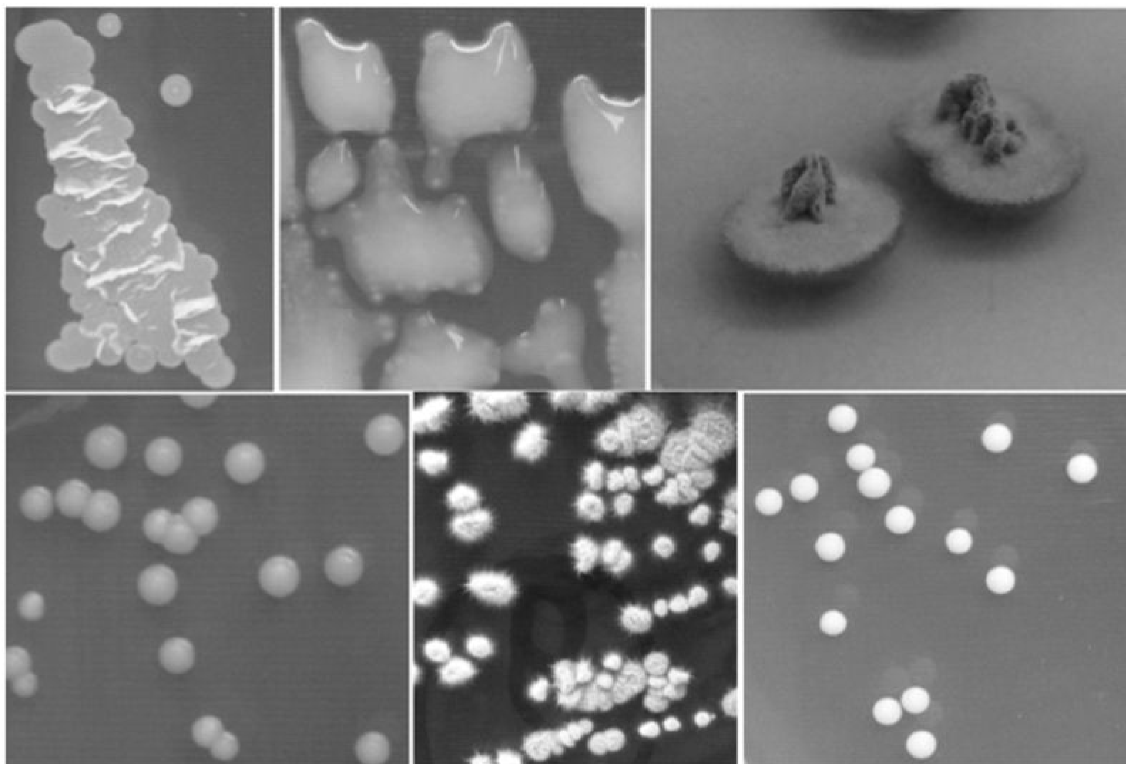


FIGURA 4.3 **Colônias de leveduras, mostrando as diferentes consistências e aspecto superficial.**

A transição da identificação fenotípica para a molecular começou com a determinação da porcentagem de guanina (G) e citosina (C) presentes no DNA nuclear. Linhagens com diferenças maiores que 1% no conteúdo de GC eram consideradas espécies diferentes. Posteriormente foram utilizadas técnicas de hibridização total do DNA. Os DNAs de linhagens de espécies de leveduras próximas fenotipicamente eram clivados e misturados, e o grau de parentesco era determinado a partir da medida de reassociação entre eles. Essa técnica era limitada e só funcionava com espécies estreitamente relacionadas. Kurtzman e Robnett (1998) sequenciaram os domínios 1 e 2 (D1 e D2, com cerca de 600 nucleótidos) do gene do RNA ribossomal (rRNA) para todas as leveduras ascomicéticas conhecidas. Estes autores verificaram que as linhagens de uma mesma espécie possuíam de zero a três diferenças nucleotídicas nessa região; linhagens com diferenças maiores poderiam pertencer a espécies distintas. Em 2000, Fell e colaboradores publicaram as sequências dos domínios D1/D2 de todas as leveduras basidiomicéticas conhecidas até aquele momento, completando, assim, uma base de dados que poderia ser acessada gratuitamente por todo o mundo científico. Como consequência, a identificação das leveduras ficou

mais rápida e precisa, e um grande número de novas espécies e gêneros tem sido descrito nos últimos anos.

Em alguns casos, a utilização das sequências de uma única região do DNA não é suficiente para diferenciar as espécies. Quando isso acontece, outros genes devem ser sequenciados e comparados. A região transcrita interna (ITS), localizada entre os genes das subunidades menor e maior do gene que codifica o rRNA, também possui cerca de 600 pares de base e apresenta diferenças suficientes para distinguir espécies. Essa região tem sido utilizada como "*barcode*" para a diferenciação das espécies fúngicas. Linhagens de uma mesma espécie geralmente não apresentam diferenças nas sequências desta região (Kurtzman e Fell, 2006; Kurtman, 2014). Outros genes que têm sido utilizados são os da citocromo oxidase II, do fator de elongação e da RNA polimerase, embora o banco de dados de sequências dessas regiões não seja tão completo quanto o das regiões D1/D2 e ITS. As análises de sequências de regiões do DNA, e mesmo a comparação das sequências de todo o genoma da levedura, têm levado à construção de uma filogenia mais conservada das espécies, e a uma identificação rápida e precisa destes micro-organismos.

4.2. Ecologia das leveduras

As leveduras podem ser encontradas em todos os biomas, ocupando uma variedade de nichos e estando bem adaptadas a diversas condições atmosféricas, altitudes, substratos e localizações geográficas. Estes micro-organismos já foram isolados de geleiras e solos da Antártica e do Ártico, lagos com alta salinidade, água, solo em geral, ar, plantas e associados a vários vertebrados e invertebrados (Starmer e Lachance, 2011). Geralmente tornam-se o grupo predominante em ambientes com altas concentrações de açúcares, como flores, frutos, exsudatos de árvores, folhas e cogumelos. Isso acontece principalmente devido à capacidade que as leveduras têm de consumir rapidamente a glicose e outros açúcares simples. A maioria das espécies tem a capacidade de fermentar a glicose até etanol, e este álcool pode inibir o crescimento de outros organismos, principalmente bactérias (Dashko *et al.*, 2014).

As leveduras são dispersas no ambiente natural principalmente por insetos, outros artrópodes e pequenos animais. Outras espécies de leveduras podem ser dispersas pelo vento e correntes de água. O papel ecológico da maioria das espécies de leveduras permanece desconhecido. Um dos motivos pelos quais isso acontece é porque os estudos de biodiversidade de leveduras são centrados na identificação taxonômica das espécies e, muitas vezes, determinam apenas os isolados mais frequentes em determinado ambiente (Deak, 2006). As estimativas indicam que apenas 1% das espécies de leveduras presentes na natureza foi descrita. Atualmente, cerca de 2.000 espécies de leveduras são conhecidas. Aproximadamente 30% dessas espécies foram descritas a partir de um único isolado, e informações acerca da ecologia e variabilidade genética e fisiológica dessas leveduras são desconhecidas ou incompletas. Sendo assim, uma abordagem mais ampla deve ser empregada para permitir uma melhor compreensão dos papéis que esses organismos têm na natureza. Isto envolve estudar as propriedades fisiológicas que permitem o crescimento e a atividade das leveduras no ecossistema, conhecer os fatores limitantes para o desenvolvimento das espécies e as interações que ocorrem entre os diferentes micro-organismos que ocupam um habitat comum.

O isolamento de leveduras a partir de vários substratos e ecossistemas tem sido um campo crescente de pesquisa, pois a biodiversidade microbiana é considerada uma das principais fontes de inovação em biotecnologia. No entanto, apenas uma pequena fração da biodiversidade de leveduras é conhecida. No Brasil, ecossistemas como a Floresta

Amazônica, o Cerrado e a Mata Atlântica podem abrigar uma riqueza imensa de espécies destes fungos ainda desconhecida para a ciência. Estas espécies podem possuir características metabólicas de valor inestimável para o desenvolvimento de processos fermentativos inovadores para a indústria.

4.3. Características metabólicas de interesse biotecnológico

Apesar de os nichos ecológicos de muitas espécies de leveduras não serem ainda conhecidos, algumas espécies têm sido utilizadas por milênios pela humanidade. Esses micro-organismos têm uma importância fundamental na área industrial, na investigação científica, na alimentação, na medicina e na agricultura. Atributos tradicionais das leveduras incluem principalmente sua utilização em processos fermentativos, na produção de bebidas alcoólicas e alimentos, bem como na produção de etanol combustível. Além disso, as leveduras têm sido utilizadas como probióticos, como hospedeiros para a expressão heteróloga de proteínas de interesse, como produtoras de enzimas e como organismos modelo para o estudo da biologia de organismos eucarióticos (Cadete *et al.*, 2014).

No que diz respeito aos processos envolvidos no metabolismo dos açúcares e na geração de energia, as leveduras podem ser classificadas como micro-organismos aeróbicos ou facultativos. As leveduras aeróbias possuem um metabolismo exclusivamente respiratório enquanto as facultativas também metabolizam a glicose por meio da fermentação. A grande maioria delas, entretanto, é aeróbia facultativa e, dependendo das condições de crescimento, do tipo e da concentração de açúcares e da disponibilidade de oxigênio no meio, exibem ora um metabolismo respiratório ora um metabolismo fermentativo.

A fermentação de diferentes carboidratos é uma das mais antigas tecnologias humanas, mas a complexidade da expressão dos genes regulatórios das vias de fermentação e a origem e as forças que determinaram a evolução deste processo metabólico ainda não foram completamente desvendadas (Figura 4.4). Especula-se que o primeiro passo para o desenvolvimento da fermentação foi a exploração pelos micro-organismos de ambientes anaeróbicos, resultando num aumento da capacidade metabólica para transformar açúcares em etanol. A habilidade de realizar a fermentação alcoólica em condições aeróbicas é conhecida como efeito *Crabtree* e as leveduras que expressam essa característica são conhecidas como *Crabtree* positivas. O efeito *Crabtree* resulta em uma menor produção de biomassa uma vez que uma fração do açúcar é convertida em etanol. Em contrapartida, leveduras *Crabtree* negativas produzem mais biomassa a partir da glicose. Para manter a taxa de crescimento quando há pouca disponibilidade de glicose no meio, as leveduras *Crabtree* positivas,

como o *S. cerevisiae*, realizam respiração sob condições aeróbicas. Entretanto se for adicionada uma maior quantidade de glicose ao meio, imediatamente esta levedura passa a realizar a fermentação alcoólica, num processo conhecido como efeito *Crabtree* de curto prazo. As vias reguladoras da respiração/fermentação ainda não estão completamente elucidadas, mas sabe-se que alguns passos acontecem ao nível da transcrição e outros operam diretamente nas enzimas envolvidas no processo de fermentação. Uma observação interessante é a de que, quando uma levedura *Crabtree* positiva cresce em cultura contínua, com baixa concentração de açúcar e, portanto, respirando o açúcar, as vias fermentativas continuam sendo expressas. No entanto, a respiração é reprimida quando uma grande quantidade de açúcar é adicionada ao meio de cultura. Por outro lado, em leveduras *Crabtree* negativas, a via fermentativa é ativada somente quando a disponibilidade de oxigênio torna-se limitante (Dashko *et al.*, 2014).

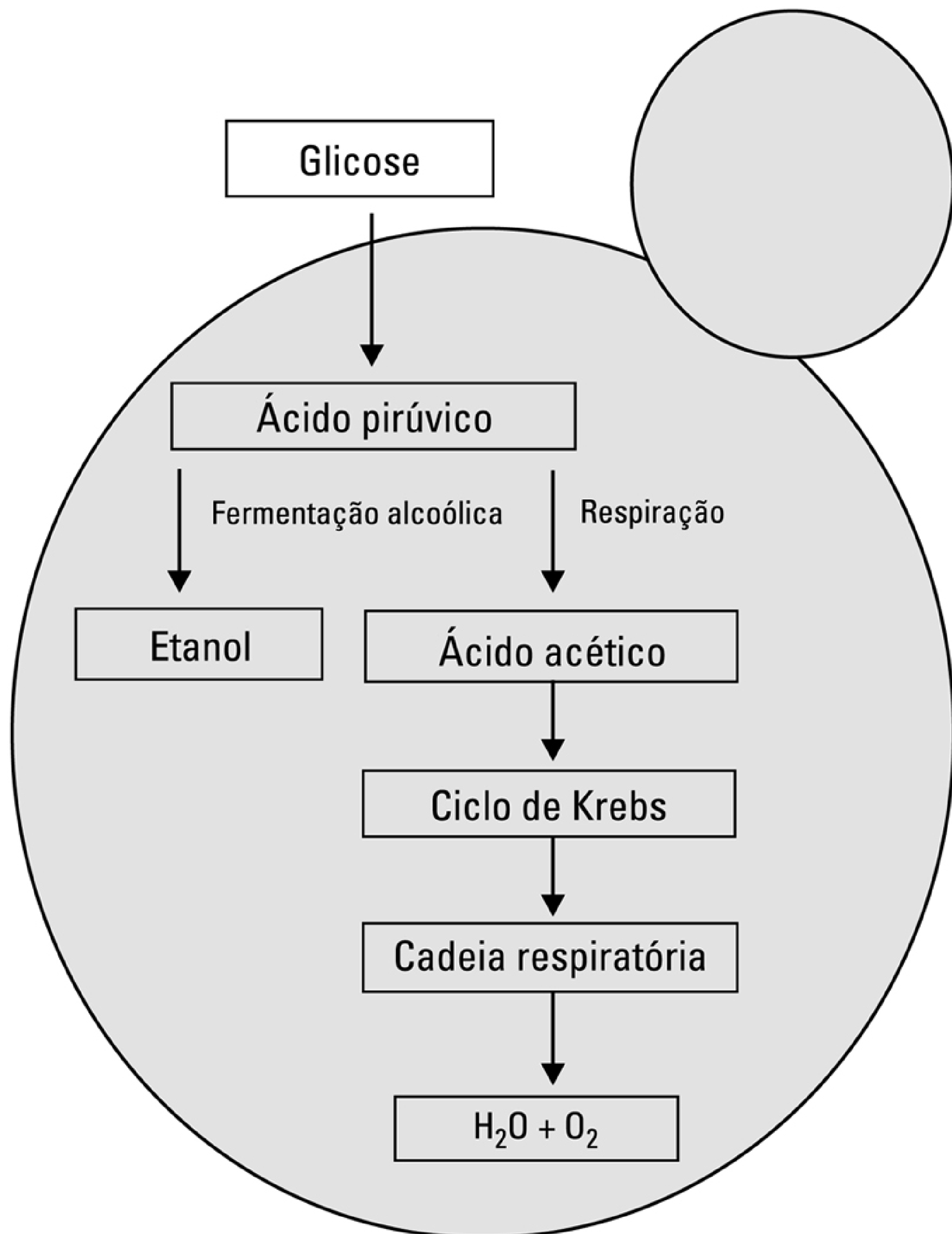


FIGURA 4.4 **Utilização da glicose por via fermentativa e por respiração por leveduras.**

No que diz respeito à produção de enzimas, quando comparadas com alguns fungos filamentosos e bactérias, as leveduras podem não parecer

muito promissoras. Entretanto, algumas linhagens foram testadas em escala laboratorial e possuem potencial para serem utilizadas na indústria. Nos últimos anos, várias pesquisas têm sido realizadas na tentativa de obter novas leveduras produtoras de enzimas. Nas indústrias de alimentos e de bebidas, por exemplo, as proteases, as amilases, as inulinases, as xilanases e as pectinases têm sido extensivamente estudadas, purificadas e caracterizadas. As amilases são bastante utilizadas na fabricação de doces e compotas; as inulinases na síntese de frutose para utilização como edulcorante e as xilanases na produção de pães. Na indústria de óleos e gorduras, o grande interesse é nas lipases e esterases, que também podem ser utilizadas na produção de detergentes e surfactantes. No setor combustível, o foco tem sido nas celulases, xilanases e B-xilosidades, que podem hidrolisar a celulose e a hemicelulose, tornando seus açúcares monoméricos (principalmente glicose e xilose) disponíveis para a fermentação (Buzzini e Vaughan-Martini, 2006).

As leveduras podem ser usadas como fonte direta de proteínas, como aditivos para a alimentação humana e animal. Durante a Primeira e a Segunda Guerra Mundial, a levedura *Candida utilis* (nome atual *Cyberlindnera jadinii*) foi utilizada como um substituto da carne ou para enriquecer produtos cárneos para alimentar os soldados, prisioneiros e a população civil. O uso de células de leveduras para a alimentação humana e/ou animal é conhecido como "single-cell protein". Estes micro-organismos têm sido também utilizados como probióticos. Micro-organismos probióticos podem ser definidos como aqueles que, após sobreviverem à passagem pelo sistema digestivo até o intestino grosso, podem colonizar de forma transitória esta porção do intestino, conferindo benefícios à saúde geral do hospedeiro. Dentre os benefícios relatados estão a modulação do sistema imune, a proteção contra micro-organismos patogênicos, melhorias na digestão e o alívio na diarreia quando esta é causada por infecções alimentares ou pelo uso de antibióticos. Para ser utilizado como probiótico, o micro-organismo deve ser resistente às enzimas do trato digestivo, capaz de se aderir à mucosa intestinal, não ser patogênico e ter efeitos positivos para o hospedeiro. A levedura mais utilizada como probiótico tem sido uma linhagem de *S. cerevisiae* conhecida comercialmente como *S. boulardii*. A vantagem de se utilizar uma levedura como probiótico é que ela não é sensível aos antibacterianos (Buzzini e Vaughan-Martini, 2006).

Além da utilização direta como fonte de proteína ou probiótico e da utilização das enzimas, outros compostos de interesse biotecnológico são sintetizados pelas leveduras e podem ser utilizados nas indústrias de alimentos e bebidas. Algumas espécies de leveduras são capazes de

produzir e acumular lipídeos no interior das células. Essas reservas algumas vezes são superiores a 70% da biomassa da levedura e podem ser interessantes também para a indústria de biodiesel (Poli *et al.*, 2014). Outros compostos interessantes são os carotenoides, que possuem propriedades antioxidantes bem conhecidas e que podem ser utilizadas não só na indústria de alimentos como também nas indústrias farmacêutica e química. O pigmento astaxantina, por exemplo, produzido pela levedura *Phaffia rhodozyma* (nome atual *Xanthophyllomyces dendrorhous*), já tem sido bastante utilizado como aditivo em alimentos para peixes salmonídeos cultivados em aquicultura. Outros carotenoides, como B-caroteno, toruleno e licopeno também são sintetizados por leveduras pigmentadas dos gêneros *Rhodotorula* e *Sporobolomyces* e têm sido estudados em escala laboratorial. Na indústria de bebidas, especialmente na de vinho e cerveja, os compostos orgânicos voláteis são de grande interesse. As leveduras são bem documentadas como produtoras desses compostos e são determinantes na produção dos aromas característicos de alguns alimentos e bebidas. Algumas vitaminas, principalmente riboflavina, e ácidos orgânicos também têm sido produzidos pelas leveduras e utilizados nas indústrias de alimentos e farmacêutica.

As leveduras também podem ser utilizadas como hospedeiras para a expressão de proteínas heterólogas, o que representa um enorme potencial principalmente para a indústria farmacêutica. As leveduras são hospedeiras interessantes de genes de interesse biotecnológico devido ao fato de serem fáceis de cultivar e manipular geneticamente. A produção de hormônios, antígenos e enzimas tem sido estudada por vários grupos de pesquisa por meio da expressão heteróloga destes produtos. A espécie *S. cerevisiae* tem sido a levedura mais utilizada como hospedeiro para a expressão destes genes, principalmente devido ao grande conhecimento sobre o seu metabolismo fermentativo e por ser considerada segura para o homem (Buzzini e Vaughan-Martini, 2006).

4.4. Aplicações industriais e biotecnológicas das leveduras

4.4.1. Histórico

Evidências arqueológicas mostram que desde o período Neolítico (8500-4000 a.C.), as bebidas alcoólicas fermentadas por leveduras eram consumidas em diversos locais, como China, Irã e Egito (McGovern *et al.*, 2004; Ulber e Soyez, 2004). Tábuas de pedra, datando de mais de 6.000 anos, encontradas na Babilônia ilustram receitas de cerveja e vinho (Ulber e Soyez, 2004; Legras *et al.*, 2007). Além dessas, vários outros alimentos fermentados também tiveram origem no período Neolítico, como o kefir e a cerveja de sorgo na África, o pulque no México, pães em diversas regiões, e vários alimentos e bebidas fermentados de soja, arroz e legumes na Ásia (Steinkraus, 2004; Aidoo *et al.*, 2006). Historicamente, foi neste mesmo período que ocorreu o aparecimento da agricultura, e acredita-se que a disponibilidade de bebidas e alimentos fermentados foi uma motivação para os humanos se estabelecerem em determinadas áreas geográficas e se tornarem agricultores (Ulber e Soyez, 2004; Legras *et al.*, 2007). Isto representou uma estratégia bem-sucedida a fim de fornecer abastecimento alimentar seguro e confiável em relação à vida nômade, além de fornecer atributos sociais, econômicos e de saúde, tanto para a alimentação quanto para o desenvolvimento humano (McGovern *et al.*, 2004).

O conhecimento e as tecnologias utilizadas na fermentação de alimentos e bebidas alcoólicas foram aperfeiçoados continuamente ao longo de milênios, e acredita-se que foram as primeiras aplicações biotecnológicas desenvolvidas. As habilidades práticas necessárias para os processos eficientes de fermentação utilizando leveduras foram transferidas de geração em geração, sem o conhecimento detalhado dos princípios científicos de tais processos. A compreensão científica das fermentações foi elucidada a partir das investigações de Louis Pasteur (1822-1895), que, em seus estudos de fermentação de vinhos e cervejas, relatou, em 1876, que os micro-organismos eram os responsáveis pela formação de álcool a partir de açúcares (Barnett, 2000). Pasteur também introduziu o conceito de condições assépticas e culturas puras para ajudar a resolver problemas em "más" fermentações, e estabeleceu a distinção entre fermentação alcoólica e crescimento aeróbio de leveduras. Pasteur também propôs que as leveduras do vinho ocorrem naturalmente na superfície das uvas, as quais fornecem uma fonte inerente de inóculo (Mortimer e Polsinelli, 1999). Portanto, a

"domesticação" da levedura *S. cerevisiae* pode ser considerada um evento central na história humana, pois esta espécie está envolvida em praticamente todos os processos industriais conhecidos que envolvem fermentação alcoólica.

Culturas puras de *S. cerevisiae* e outras leveduras foram estabelecidas posteriormente por mestres cervejeiros da Alemanha (1888-1890) (Verstrepen *et al.,* 2006). Emil Fischer e Eduard Büchner e seus contemporâneos começaram a elucidar as bases fisiológicas do metabolismo das leveduras no final dos anos 80, através de estudos bioquímicos e metabólicos detalhados, o que levou a descobertas fundamentais na área. Estudos de pesquisadores de leveduras, incluindo C. B. van Niel, A. J. Kluyver, L. J. Wickerham, H. P. Phaff e C. P. Kurtzman, levaram à compreensão de ecologia, diversidade molecular, fisiologia e valor tecnológico das leveduras, e inauguraram a era moderna da biotecnologia de leveduras (Lachance, 2003; Robertson, 2003). Pela importância histórica, *S. cerevisiae* foi o primeiro organismo eucariótico a ter todo o genoma sequenciado, e continua a ser o micro-organismo mais bem caracterizado e explorado pelo homem (Fisk *et al.,* 2006; Laughery *et al.,* 2015).

4.4.2. Produtos fermentados

O uso de leveduras na produção de pão, cerveja e vinho foi sendo aprimorado e, desde o início do século XX, a aplicação do fermento se tornou uma prática padrão na fermentação industrial destes produtos. Ao longo dos anos, o uso de leveduras para a produção de alimentos e bebidas se ampliou para a produção de produtos lácteos, produtos à base de carne, produtos de panificação e bebidas alcoólicas além do vinho e cerveja (Samelis e Sofos, 2003; Hammes *et al.,* 2005). O papel das leveduras na fermentação destes produtos é bem conhecido há muito tempo. Estudos que revelam a rica biodiversidade de leveduras em muitos desses produtos fermentados têm mostrado que certas espécies ou linhagens podem desempenhar um papel crucial também na maturação e qualidade do produto final, principalmente no desenvolvimento de sabor e aroma (Deak, 2009).

4.4.2.1. Bebidas alcoólicas fermentadas

As leveduras participam da produção de todas as bebidas alcoólicas, devido à capacidade de algumas espécies em fermentar açúcares a etanol de maneira rápida e eficientemente e, ainda, à capacidade de tolerar

elevadas concentrações de etanol (15-20%). As bebidas alcoólicas representam uma grande diversidade de produtos, desde os vinhos de mesa, licores, espumantes, sidra e outros vinhos de fruta, saquê, cerveja, além dos produtos destilados alcoólicos e muitas bebidas fermentadas tradicionais (Fleet, 1997; Lea e Piggott, 2012).

Usando os princípios da fermentação alcoólica, praticamente qualquer sumo de fruta ou extrato de cereais pode ser fermentado por leveduras, para se obter um produto alcoólico. A matéria-prima deve fornecer os carboidratos fermentáveis (glicose, frutose, sacarose) e o pH inicial deve ser suficientemente baixo (pH 3-4) ou o extrato deve ser esterilizado a fim de reduzir contaminações. Posteriormente as culturas de leveduras são inoculadas (Tamang e Fleet, 2009).

Cerveja

Cerveja é a bebida fermentada a partir de grãos de cereais maltados, principalmente da cevada, que apresenta um conteúdo de etanol de 2-8% e um sabor característico que se origina a partir de componentes dos extratos de malte e do lúpulo, e de produtos do metabolismo da levedura. A cevada é germinada e seca em um processo chamado de maltagem. Em seguida, a cevada maltada é extraída com água (brasagem) para se obter o extrato, denominado mosto, que contém carboidratos fermentáveis e outros nutrientes que serão substratos para o metabolismo da levedura. O mosto é fervido com lúpulo, clarificado e depois fermentado. Após a fermentação, a cerveja é clarificada, condicionada ou maturada, se necessário, e engarrafada (Fleet, 1997; Dufour *et al.*, 2003). O mosto cozido é essencialmente estéril e a fermentação é realizada por meio da inoculação de culturas puras de leveduras, em um processo chamado '*pitching*' pelos mestres cervejeiros. Atualmente, as linhagens utilizadas são pertencentes às espécies *S. cerevisiae* e *S. pastorianus*. No entanto, a literatura mais antiga cita também como leveduras de cerveja as espécies *S. carlsbergensis* e *S. uvarum*, as quais foram reclassificadas como *S. cerevisiae* e *S. bayanus*, respectivamente (Kurtzman, 2003; Kurtzman e Robnett, 2003).

Dois tipos de leveduras são conhecidos no processo de produção de cerveja. As leveduras de baixa fermentação (*bottom fermenting yeasts*), representadas pela espécie *S. pastorianus*, produzem as cervejas do tipo *lager*. Este tipo de cerveja é o mais comercializado no mundo, e o estilo "American adjunct lager" é o principal produzido no Brasil. O outro tipo de levedura utilizado é a de alta fermentação (*top fermenting yeasts*), cuja espécie utilizada é o *S. cerevisiae*, que produz as cervejas do tipo *ale*. Estas cervejas são chamadas também de especiais ou artesanais. O país que mais produz este tipo de cerveja é a Bélgica, mas em todo o mundo existe um

interesse na produção deste tipo de cerveja, principalmente pela riqueza de estilos e aromas. No Brasil, as micro e nanocervejarias são responsáveis, em sua maioria, pela produção deste tipo de cerveja. Há uma grande diversidade nos estilos de cervejas produzidas mesmo dentro de uma única cervejaria (*stout*, *pilsner*, *Porter*, etc.); o estilo depende da matéria-prima, do processo de trituração, fermentação e condicionamento, e da linhagem da levedura. Há uma significativa diversidade metabólica, fisiológica e genética entre as linhagens utilizadas, e estas determinam o aroma final, a qualidade da cerveja e a eficiência do processo (Blasco *et al.*, 2011; Carrau *et al.*, 2015). Algumas propriedades-chave são utilizadas por cervejeiros na seleção de linhagens, tais como: o perfil de compostos voláteis produzidos que conferem o aroma (álcoois, ésteres, compostos carboxílicos e voláteis de enxofre); a taxa e conteúdo de açúcares do mosto (fermentação principalmente de maltose e maltotriose); fermentação a temperaturas baixas (7-15°C) ou mais elevadas (20-30°C); características de sedimentação e floculação; requerimento de oxigênio; tolerância a etanol e osmotolerância. Após a fermentação, as células das leveduras são recolhidas, algumas vezes lavadas com ácido, para diminuir a contaminação bacteriana, e armazenadas a 4-5°C, e então são usadas para inocular o próximo lote de mosto (Tamang e Fleet, 2009). Geralmente, leveduras de cerveja podem ser recicladas cerca de 7-8 vezes, antes de seu desempenho diminuir.

O crescimento de outras leveduras, que não sejam as linhagens desejadas, durante a fermentação e maturação ou depois de engarrafada vai levar a um sabor ruim e turbidez da cerveja. Espécies fermentadoras dos gêneros *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspora*, *Zygosaccharomyces* e *Dekkera* são capazes de causar tal deterioração. A exposição da cerveja ao ar favorece o crescimento de espécies oxidativas dos gêneros *Pichia*, *Debaryomyces*, *Candida* e *Dekkera*. Espécies de *Dekkera* produzem altos níveis de ácido acético e ésteres, já as espécies de *Pichia* levam à produção excessiva de ésteres, enquanto outras espécies podem levar a sabores fenólicos desagradáveis e podem, ainda, fermentar carboidratos residuais da cerveja (Dufour *et al.*, 2003; Romano *et al.*, 2006). Boas práticas de fabricação e higiene são necessárias para prevenir esses resultados.

Algumas cervejas, tais como as produzidas em países africanos e as cervejas *lambics* da Bélgica, ainda são produzidas por processos tradicionais, onde misturas de leveduras selvagens e bactérias realizam as fermentações. Nestes casos, as leveduras representam uma mistura de linhagens pertencentes às espécies dos gêneros *Saccharomyces* e *Dekkera* (Schifferdecker *et al.*, 2014).

Vinhos

Os vinhos são os produtos da fermentação alcoólica do suco de uva. A indústria internacional de vinhos é extensa e produz diferentes tipos e estilos de vinhos, dependendo da uva, de sua origem geográfica e do processo de produção do vinho. Até 50-75 anos atrás, a maioria dos vinhos eram produzidos por fermentação alcoólica espontânea do suco de uva pelas leveduras nativas, originadas da superfície da uva e de equipamentos da vinícola ou trazidas para o ambiente de fermentação por insetos (Raspor *et al.,* 2006). Anos de pesquisa identificaram linhagens de *S. cerevisiae* e *S. bayanus* como as principais leveduras de fermentação do vinho. Hoje, essas leveduras são liofilizadas e comercialmente disponibilizadas para serem inoculadas no suco de uva e dar início à fermentação alcoólica (Pretorius, 2000).

Em enologia, é muito discutido como as leveduras nativas podem contribuir para o aroma e *bouquet* (sensações olfativas adquiridas pelo vinho no ambiente reduzido da garrafa, englobando aromas primários e secundários - característica de vinhos envelhecidos) da bebida. Alguns especialistas questionam o uso de inóculos selecionados e preferem as leveduras nativas para manter o caráter específico do *terroir* (ambiente de uma região produtora de vinhos, englobando o solo, microclima e todos os elementos relativos à atuação do homem na fabricação da bebida, dando ao vinho uma especificidade única). Experimentos em escala laboratorial têm sido realizados mostrando o papel potencial das outras leveduras não *S. cerevisiae* na produção de vinhos. Entre estas, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Pichia fermentans*, *Starmerella bacillaris* (antiga *Candida stellata*) e outras foram sugeridas como novos adjuvantes em misturas simultâneas ou sequenciais com *S. cerevisiae* (Clemente-Jimenez *et al.,* 2005; Moreira *et al.,* 2005).

O suco de uva recém-extraído abriga uma população de leveduras de 10^3-10^5 unidades formadoras de colônias (ufc/ml), composta principalmente por espécies dos gêneros *Hanseniaspora*, *Metschnikowia*, *Starmerella*, *Rhodoturula*, *Sporobolomyces*, *Cryptococcus* e *Candida*. O suco contém baixas populações de espécies nativas de *Saccharomyces*. A fermentação é iniciada pelo crescimento das leveduras presentes, sendo que as "não-*Saccharomyces*" são geralmente limitadas aos primeiros 2-4 dias de fermentação, após o qual estas morrem (Moreira *et al.,* 2005). As leveduras não *Saccharomyces* alcançam populações máximas de 10^6-10^7 ufc/ml antes de morrer, e influenciam no comportamento metabólico da fermentação e nos produtos liberados para o vinho que conferem sabor e qualidade ao vinho. A morte destas é atribuída à intolerância às altas concentrações de etanol, largamente produzido pelas espécies *Saccharomyces*. Após 4 dias,

aproximadamente, a fermentação é continuada e concluída pelas espécies *Saccharomyces*, especialmente linhagens de *S. cerevisiae* e *S. bayanus*. A análise molecular de *S. cerevisiae* isoladas a partir da fermentação espontânea de vinho mostrou uma grande diversidade, sendo representadas quase sempre por mais de uma linhagem. Assim, as fermentações de vinho refletem não só uma sucessão ecológica de diferentes espécies de leveduras, mas também a sucessão de linhagens dentro da mesma espécie (Fleet, 2003), contribuindo assim para uma grande diversidade bioquímica e metabólica no processo de fermentação.

Vinhos espumantes e vinhos fortificados são todos produzidos a partir de uma base de vinho fermentado do suco de uva com leveduras, de uma forma similar aos vinhos de mesa (Fleet, 2003). Nos vinhos espumantes, a base de vinho é submetida a uma fermentação secundária, tradicionalmente conduzida na garrafa para reter o dióxido de carbono dissolvido (efervescência) produzido durante esta fermentação. Cerca de 2% de açúcar fermentável é adicionado à base de vinho, juntamente com uma linhagem selecionada de *S. cerevisiae*. A mistura, engarrafada e selada, é fermentada de 6 meses a 2 anos. A levedura, após a fermentação, sedimenta e sofre autólise, contribuindo com o sabor característico e outras propriedades físicas do espumante. A levedura é posteriormente removida em um processo chamado '*disgorgement*' (Howe, 2003). Linhagens selecionadas de *S. cerevisiae* são necessárias para a fermentação secundária. Os critérios para seleção incluem: fermentação sob as condições da garrafa, alta concentração de etanol (8-12%), baixo pH (cerca de 3.0), baixa disponibilidade de nutrientes e alta pressão de dióxido de carbono (até 600 kPa); capacidade de floculação e sedimentação para facilitar a remoção das células; sofrer autólise; e dar bons sabores (Fleet, 2003).

Vinhos fortificados incluem produtos como o *sherry* (vinho espanhol, da região de Xerez) e o vinho do porto (Portugal) que têm concentrações de etanol de 15-22%. Esta concentração de etanol mais elevada é obtida através da adição de etanol (normalmente, proveniente da destilação do vinho) em certas fases durante o processo (Reader e Dominiquez, 2003). No caso do *sherry*, o vinho é fortificado em tonéis de madeira por um processo de maturação chamado sistema de "solera". Este processo estimula a formação de uma película ou "véu" de leveduras na superfície do vinho. O "véu" é uma camada espessa de biomassa de levedura e consiste em uma mistura de linhagens hidrofóbicas de *S. cerevisiae*, mas linhagens de *Torulaspora delbureckii*, *Dekkera bruxellensis* e diferentes espécies de *Candida* e *Zygosaccharomyces* também podem ser encontradas. O metabolismo oxidativo das leveduras do 'véu' diminui as concentrações de ácido, glicerol e álcool, e aumenta substancialmente a concentração de

acetaldeído, contribuindo, assim, para o sabor único do '*sherry*' (Esteve-Zarzoso *et al.*, 2004).

Entre os vinhos de frutas, a sidra produzida a partir de sumo de maçã tem sido mais estudada. Da mesma forma que os vinhos de uva, a sidra é produzida pela fermentação tradicional por leveduras nativas, ou linhagens selecionadas de *S. cerevisiae* ou *S. bayanus*. Em ambos os casos, existe um desenvolvimento sucessivo de espécies e linhagens de leveduras em todo o processo, como observado na produção dos vinhos tradicionais (Carrau *et al.*, 2015).

O saquê é uma bebida fermentada tradicional do Japão fabricada a partir do extrato de arroz, e classificada na mesma categoria de vinhos (Fleet, 1997). Inicialmente, o arroz é tratado com fungos filamentosos amilolíticos e proteolíticos (espécies de *Aspergillus* e *Rhizopus*) para produzir o '*Koji*', uma mistura rica em açúcares fermentáveis e enzimas que degradam o amido. O '*Koji*' é então misturado com arroz vaporizado, água e uma cultura de levedura selecionada para a fermentação alcoólica. Após a fermentação, o material líquido é separado dos sólidos para dar o saquê. Linhagens únicas de *S. cerevisiae* evoluíram para realizar estas fermentações gerando produtos com elevado teor de etanol (12-20%), e com sabores e aromas intensos (Bokulich *et al.*, 2014).

Bebidas destiladas

Produtos destilados formam uma grande parte do mercado de bebidas alcoólicas. A produção destes pode ser dividida em cinco etapas: (i) seleção da matéria-prima; (ii) processamento da matéria-prima para gerar um extrato fermentável; (iii) fermentação alcoólica por leveduras; (iv) destilação do material fermentado; e (v) tratamento pós-destilação (Tamang e Fleet, 2009). Exemplos de bebidas destiladas englobam o uísque, um produto destilado a partir de cereais fermentados; o rum, produzido da destilação de fermentado de cana-de-açúcar ou melaço; conhaques que são preparados a partir de destilados de sucos de frutas fermentadas; a tequila produzida a partir da fermentação de suco de agave; e a popular cachaça brasileira destilada a partir de caldo de cana-de-açúcar fermentado. Além disso, há uma grande variedade de bebidas aromatizadas, como o gin e a vodca. Estas são geralmente produzidas por fermentação alcoólica de extratos a partir de cereais ou seus produtos agrícolas e, em seguida, são destiladas. Sabores específicos são adicionados ao destilado para se obter determinados produtos (Watson, 1993).

Os produtores geralmente adquirem linhagens comerciais de *S. cerevisiae* que são inoculadas na matéria-prima com cerca de 10^6-10^7 ufc/ml para iniciar e conduzir a fermentação. No entanto, estas linhagens comerciais

devem competir com outras leveduras e bactérias contaminantes que estão presentes na matéria-prima ou equipamentos. Os principais critérios para a seleção de linhagens incluem produção eficiente de elevadas concentrações de etanol, e produção de um perfil desejado de sabores voláteis que são transpostas para o destilado. Em alguns casos, os processos tradicionais ainda são conduzidos, onde leveduras nativas contribuem significativamente para a fermentação e sabor do produto. Na produção de tequila, além de *S. cerevisiae*, espécies como *Hanseniaspora vineae*, *Candida magnoliae* e *Pichia kudriavzevii* contribuem para a fermentação (Lachance, 1995). Na produção de rum, linhagens de *Schizosaccharomyces pombe* podem contribuir na fabricação de runs mais pesados, enquanto a bebida mais leve é produzida por linhagens de *S. cerevisiae* (Tamang e Fleet, 2009). A cachaça é produzida com leveduras de panificação em destilarias de cachaça de coluna (também chamadas cachaças industriais, sendo destiladas em colunas de aço inoxidável), e por fermentação espontânea, com predominância de linhagens indígenas de *S. cerevisiae* em destilarias de cachaça de alambique (também chamada cachaça artesanal, sendo destilada em alambiques de cobre) (Pataro *et al.*, 2000; Badotti *et al.*, 2014). Atualmente, também para a produção de cachaça já existem linhagens comerciais de *S. cerevisiae* próprias para a fabricação desta bebida. Estas linhagens propiciam a produção de uma bebida com sabor e aroma mais constantes durante a safra e entre safras diferentes.

4.4.2.2. Produtos de panificação

A produção de pão é um antigo processo biotecnológico baseado na fermentação de uma massa de farinha de trigo ou outros cereais. A ecologia microbiana destas fermentações tem sido estudada, e sabe-se que *S. cerevisiae* é a principal levedura da maioria das fermentações de pão (Hammes *et al.*, 2005). O fabricante de pão normalmente adquire a levedura comercialmente, essa é adicionada à massa e incubada a 30-35°C durante tempos variáveis (dependendo do processo) para a fermentação. Os substratos são principalmente maltose e glicose, liberados pela quebra do amido de trigo por amilases endógenas da farinha. A fermentação conduzida pelas leveduras tem várias funções. A produção de gás (CO_2) provoca expansão e fermentação da massa, o que afeta a textura, a densidade e o volume do pão. O CO_2 dissolvido forma ácido carbônico que, juntamente com o etanol produzido pela levedura e as enzimas da levedura, afetam as proteínas do cereal e influenciam as propriedades reológicas da massa impactando na textura e estrutura final do pão. Os metabolitos secundários (álcoois, ácidos, ésteres, aldeídos, cetonas, etc.)

produzidos pelas leveduras e bactérias associadas com a fermentação conferem sabor característico ao pão. A maioria destes metabolitos é volátil e é perdida durante o cozimento, mas também pode sofrer reações complexas com outros componentes da massa durante o cozimento que afetam o sabor do pão (Hammes *et al.*, 2005; Decock e Cappelle, 2005).

Houve grande desenvolvimento na seleção e melhoramento genético de linhagens de *S. cerevisiae* para indústrias de pão. Os requisitos principais das linhagens são rápida fermentação e produção de CO_2 a partir de maltose e glicose, e geração de sabor desejável ao pão. Já as linhagens utilizadas para fermentar massas doces, onde é adicionada sacarose, precisam ser mais osmotolerantes, e linhagens usadas em massas congeladas devem tolerar o congelamento e descongelamento. Além disso, as linhagens de leveduras para panificação, geralmente processadas como leveduras secas, precisam ser tolerantes a estresse térmico (Bonjean e Guillaume, 2003; Brandt, 2014). Além de *S. cerevisiae*, pelo menos 25 espécies diferentes de leveduras foram descritas a partir da massa fermentada, dentre estas, *Candida milleri*, *C. glabrata* e *P. kudriavzevii* podem ser dominantes (Minervini *et al.*, 2014), e *S. exiguus* (nome atual *Kazatschania exigua*) e *Candida humilis* têm sido utilizadas em preparações de massas fermentadas comerciais (Hammes *et al.*, 2005;. Brandt, 2014). Além das leveduras, bactérias também contribuem no processo de fermentação do pão, incluindo *Lactobacillus sanfranciscensis* (único para estes ecossistemas), *Lactobacillus plantarum*, e outras espécies de *Lactobacillus*, *Pediococcus* e *Leuconostoc* (Hammes *et al.*, 2005; De Vuyst *et al.*, 2014). Fermentos comerciais de combinações de leveduras (*S. cerevisiae*) e bactérias já estão disponíveis (Brandt, 2014).

Muitos tipos de pão, especialmente em países europeus, ainda são produzidos por processos tradicionais, onde não são adicionadas linhagens comerciais de leveduras. Leveduras nativas e bactérias do ácido láctico conduzem a fermentação da massa, e os produtos resultantes têm teores mais elevados de ácido láctico e ácido acético devido ao crescimento bacteriano (De Vuyst *et al.*, 2014). O pão "*Sourdough*" ("pão azedo") é um exemplo de fermentação natural que envolve o crescimento de leveduras nativas e bactérias do ácido láctico, sendo um pão de sabor ácido feito a partir de centeio, trigo ou de farinhas mistas da Europa e da América do Sul (De Vuyst *et al.*, 2014).

4.4.2.3. Produtos derivados de carnes fermentados

Produtos derivados de carnes fermentados são divididos em dois grandes grupos: aqueles feitos com pedaços ou fatias inteiras de carne, tais como

carne seca, presuntos curados e secos, e aqueles feitos com carnes trituradas ou cortadas, que são as salsichas e produtos do tipo salame. O processamento de carnes consiste na combinação de cura química, fermentação microbiana e secagem, que resultam no produto estável e seguro. Os micro-organismos envolvidos na produção de derivados de carnes são bactérias láticas, estafilococos, micrococos, fungos e leveduras (Bacus, 1984; Ivey *et al.,* 2013).

As bactérias têm papel dominante na fermentação de carnes, contudo a contribuição das leveduras ainda assim é significante. Existem dois estágios durante o processamento no qual o crescimento e atividade das leveduras são considerados relevantes contribuindo com compostos responsáveis pelo sabor do alimento. Estas incluem a fase inicial de fermentação, importante para produção de salsichas do tipo salame, e o armazenamento e maturação do produto, importante para a produção de salame e presuntos curados e secos (Ivey *et al.,* 2013).

Os ingredientes para produção de salsicha incluem carne picada ou seca (boi, porco ou ovelha), cloreto de sódio, nitrito/nitrato de sódio, sacarose e uma gama de especiarias de acordo com o produto (Campbell-Platt e Cook, 1995). A população inicial de leveduras é, geralmente, baixa (menor que 10^3-10^4 ufc/g) e se origina a partir dos ingredientes e equipamentos do processo. As leveduras estão naturalmente presentes na pele de animais e podem contaminar a carne fresca durante o abate. Diversos fatores podem alterar o crescimento de leveduras durante a produção de salsichas fermentadas e presuntos, como defumação, adição de especiarias, concentração de sal, umidade relativa e temperatura (Cocolin *et al.,* 2011; Rantsiou e Cocolin, 2006).

Uma diversidade de espécies de leveduras tem sido isolada a partir de presuntos curados e embutidos fermentados produzidos em diferentes países. *Debaryomyces hansenii* é a levedura mais frequentemente isolada, além de *Yarrowia lipolytica*, *Rhodotorula mucilaginosa*, *Candida zeylanoides* e *Metschnikowia pulcherrima* que também merecem uma menção especial (Ivey *et al.,* 2013). Considera-se que as leveduras contribuem no desenvolvimento de cor e sabor em embutidos fermentados e presuntos curados, devido às propriedades metabólicas dessas, como a capacidade de eliminação de oxigênio, produção de proteases e lipases extracelulares, utilização de ácidos orgânicos tais como ácido láctico, e produção de sabores voláteis, como álcoois, ácidos, ésteres e várias carboxilas. *Debaryomyces hansenii* é conhecida pela sua atividade proteolítica, enquanto *Y. lipolytica* tem forte atividade lipolítica e proteolítica. *D. hansenii* e *Y. lipolytica* são leveduras candidatas para o desenvolvimento de novas culturas comerciais para a produção de embutidos e presunto, uma vez que podem melhorar o sabor,

textura e cor, e diminuir os tempos de processamento destes alimentos (Tamang e Fleet, 2009).

4.4.2.4. Produtos lácteos fermentados

Produtos lácteos fermentados são geralmente classificados como (i) produtos de baixa acidez (por exemplo, soro de leite coalhado e creme de leite); (ii) produtos de média acidez (por exemplo, iogurte e queijo); (iii) produtos de elevada acidez (por exemplo, leite azedo Búlgaro); e (iv) produtos ácidos e alcoólicos (por exemplo, kefir e koumiss). Em termos microbiológicos, a produção destes produtos é normalmente associada com o crescimento e atividades metabólicas de bactérias do ácido láctico durante a fermentação inicial do leite. No entanto, as leveduras e outros micro-organismos podem juntar-se a essas e contribuir para o desenvolvimento de sabor e textura (Ivey *et al.*, 2013).

As leveduras apresentam baixo crescimento no leite inoculado com altos níveis de bactérias de ácido láctico e, consequentemente, não são significativas nas fases de fermentação do leite para produção de queijo ou iogurte (Cavanagh *et al.*, 2015). Contudo, análises microbiológicas de queijos encontrados nos mercados mostram a presença de altas populações de leveduras (10^6-10^9 ufc/g), especialmente no queijo "soft-brined" (cremoso salgado) e variedades de queijos curados macios ou semimacios, como Brie, Camembert e Gorgonzola (Roostita e Fleet, 1996). Uma diversidade significativa de espécies de leveduras foi isolada a partir de produtos lácteos (Romano *et al.*, 2006), no entanto, as espécies predominantes são *D. hansenii*, *Y. lipolitica*, *S. cerevisiae*, *K. marxianus* e *G. geotrichum* (Addis *et al.*, 2001; Romano *et al.*, 2006). Dentre essas, a *Debaryomyces hansenii* já tem sido comercializada como potencial cultura adjunta (Padilla *et al.*, 2014). Em queijos artesanais brasileiros, como o queijo Minas Curado, as leveduras também exercem um papel relevante durante a maturação. As principais espécies presentes são *D. hansenii, K. marxianus*, *K. lactis* e *Kodamaea ohmeri* (Cardoso *et al.*, 2015). Estas espécies têm sido encontradas em maior frequência em queijos Minas maturados de 7 a 60 dias.

Investigações detalhadas sobre a ecologia microbiana da produção de queijo mostraram que as leveduras são o componente principal da microbiota da maturação do queijo (Ferreira e Viljoen, 2003; Das *et al.*, 2005; Leroy *et al.*, 2006). *Saccharomyces cerevisiae*, *D. hansenii* e *Y. lipolytica* são consideradas boas candidatas a agentes de maturação em queijos cremosos (Ferreira e Viljoen, 2003), enquanto *Geotrichum candidum* parece ser essencial na produção de queijo Camembert (Boutrou e Guéguen, 2005).

Dentre as funções que as leveduras exercem durante a maturação do queijo pode-se destacar as atividades proteolíticas e lipolíticas, produzidas pelas leveduras *D. hansenii* e *Y. lipolytica* e que conferem sabor e textura ao queijo, fermentação de lactose residual por *K. marxianus*, e utilização de ácidos orgânicos como o ácido láctico e ácido cítrico (Cardoso *et al.*, 2015).

4.5. Bioetanol

Considerando a exploração de leveduras, além dos campos de alimentos e bebidas, a aplicação biotecnológica mais importante é a produção de bioetanol para aditivo da gasolina ou até mesmo como substituto. O interesse em bioetanol como combustível renovável tem flutuado substancialmente em resposta às crises do petróleo. Além disso, o etanol combustível é frequentemente associado ao conceito de energia verde, ou seja, fonte eficiente de energia que contribui para a redução das emissões de gases causadores do efeito estufa e outros impactos ambientais (Bhattarai *et al.*, 2011). Atualmente, Estados Unidos e Brasil produzem cerca de 83% da oferta mundial de etanol combustível (Renewable Fuels Association, 2015). O etanol produzido a partir do amido de milho nos Estados Unidos, e da sacarose da cana-de-açúcar no Brasil, é classificado como etanol de primeira geração (1G). Esforços vêm sendo feitos para implementação da produção de etanol a partir de biomassa lignocelulósica, denominado etanol de segunda geração (2G). A biomassa é uma matéria-prima de baixo custo, sustentável e que engloba uma variedade de resíduos agroindustriais disponíveis em ampla variedade (Premjet *et al.*, 2013).

A levedura *S. cerevisiae* é utilizada com sucesso na produção industrial de etanol, devido às suas características industriais já abordadas anteriormente, capacidade de fermentar hexoses rápido e eficientemente, alta tolerância a etanol, e tolerância a inibidores e ao baixo pH encontrado nos tanques de fermentação (Basso *et al.*, 2008). Entretanto, *S. cerevisiae* é incapaz de fermentar pentoses, como a D-xilose que é o principal produto da hidrólise da hemicelulose (Kumar *et al.*, 2009). Neste sentido, a conversão para etanol de hidrolisados lignocelulósicos com leveduras capazes de fermentar xilose é de preocupação primordial.

As primeiras pesquisas voltadas à conversão D-xilose em etanol pelas leveduras surgiram na década de 1980. Inicialmente, as principais espécies fermentadoras de xilose relatadas foram *Pachysolen tannophilus*, *Scheffersomyces stipitis* (nome antigo *Pichia stipitis*) e *Scheffersomyces shehatae* (nome antigo *Candida shehatae*), e estas foram objeto de diversos estudos, sendo que *S. stipitis* era considerada a melhor levedura fermentadora de xilose e fonte de genes para a engenharia metabólica de *S. cerevisiae* (Kötter *et al.*, 1990). Atualmente, *Spathaspora passalidarum* é considerada a melhor levedura produtora de etanol a partir de D-xilose (Hou, 2012; Long *et al.*, 2012). Além dessa, outras espécies do gênero, como *S. arborariae*, *S. girioi*, *S. gorwiae*, *S. hagerdaliae*, *S. brasiliensis*, *S. roraimanensis*, *S. suhii* e *S.*

xylofermentans, todas isoladas de ecossistemas brasileiros, também são capazes de produzir etanol e de xilitol a partir de D-xilose (Cunha-Pereira *et al.*, 2011; Hickert *et al.*, 2013; Martiniano *et al.*, 2013; Cadete *et al.*, 2014; Lopes *et al.*, 2016). Estas leveduras são promissoras para serem utilizadas em processos industriais, mas necessitam ser "domesticadas", ou seja, adaptadas aos processos fermentativos da indústria, para resistirem aos estresses metabólicos presentes em fermentações industriais.

4.6. Leveduras como produtoras de moléculas de relevância industrial

4.6.1. Enzimas

Enzimas são complexos proteicos que são produzidos por organismos vivos para realizarem uma reação bioquímica específica. Embora sejam produzidas por células vivas, podem ser extraídas dos organismos e imobilizadas em bioreatores para aplicações biotecnológicas (Jemli *et al.*, 2014; Tanokura *et al.*, 2015). A descoberta do processo de "fermentação sem células", usando extratos livres de células, deu a Eduard Buchner, em 1907, o Prêmio Nobel. Este processo de utilização de enzimas livres e de células inteiras (biocatalizadores) é parte integrante de bioprocessos utilizados nas indústrias química, famacêutica e agrícola (Aehle, 2004; Panke *et al.*, 2004).

As enzimas comercialmente disponíveis no mercado são derivadas de animais, plantas e micro-organismos, sendo mais de 50% de origem microbiana (Jemli *et al.*, 2014). Quando comparado com as enzimas produzidas por animais e plantas, as enzimas microbianas sobressaem pelo fato de serem mais estáveis e cobrirem uma variedade maior de atividades catalíticas. Além disso, existem vantagens relacionadas com os micro-organismos. Dentre estas destacam-se: a) crescimento rápido dos micro-organismos; b) grande variedade de espécies produtoras; e c) capacidade adaptativa em diferentes meios e condições de cultivo (Lefevre *et al.*, 2007). Essas vantagens contribuem de forma significativa para produção de enzimas em larga escala. Recentemente vários trabalhos têm sido publicados evidenciando a produção de enzimas pelas leveduras, como xilanases, proteases, lipases, fosfolipases, β-galactosidase, inulinases entre outras (Kurtzman, 2011; Morais *et al.*, 2013a; 2013b; Cardoso *et al.*, 2015).

As xilanases têm sido empregadas nas indústrias de papel (para clareamento da polpa), de alimentos (na produção de ração animal, pães e bebidas como vinhos e sucos) e têxteis (tratamento das fibras de tecidos de linho e algodão) e como agentes de hidrólise para a fabricação de biocombustíveis (Carrasco *et al.*, 2012). Várias linhagens de leveduras isoladas de materiais vegetais já foram descritas como produtoras de xilanases, dentre as quais pode-se destacar: *Candida intermedia, C. tropicalis, Meyerozyma guilliermondii, Scheffersomyces shehatae, Sugiyamaella smithiae, Cryptococcus diffluens* (atualmente *Naganishia diffuens*), *Cr. heveanensis* (atualmente *Kwoniella heveanensis*), *Cr. laurentii* (atualmente *Papiliotrema*

laurentii) e *Trichosporon mycotoxinivorans* (atualmente *Apiotrichum mycotoxinivorans*) (Morais *et al.*, 2013a; 2013b; Lara *et al.*, 2014).

As inulinases são enzimas responsáveis pela liberação de frutose a partir da inulina, que é um polímero de reserva presente em várias plantas da família Asteraceae (Ricca *et al.*, 2007). As inulinases comerciais têm sido utilizadas para a produção de xarope de frutose, que é utilizado como adoçante alternativo, saudável e seguro em substituição da sacarose, que pode causar problemas relacionados com aterosclerose e diabetes. Dentre as leveduras, a espécie *K. marxianus* é relatada como uma potencial produtora dessa enzima em níveis comerciais (Jain *et al.*, 2012).

As β-galactosidases são responsáveis pela hidrólise da lactose presente no leite. Essas enzimas são de grande importância na indústria, para a produção de alimentos lácteos sem lactose, pois estima-se que 2/3 da população mundial apresente intolerância a este açúcar. A levedura *Kluyveromyces lactis* é produtora de ß-galactosidases utilizadas comercialmente (Mazi *et al.*, 2012).

As lipases e fosfolipases são usadas como biocatalisadores na degradação de óleos; geração de aromas e sabores; modificação estereoespecífica de produtos farmacêuticos, pesticidas e cosméticos; tratamento de resíduos de água; produção de detergentes; aditivos de alimentos; ensaios biomédicos; processamento de couro, entre outros. Estas enzimas estão presentes em animais, plantas, bactérias, fungos filamentosos e leveduras, sendo estas últimas a principal fonte de lipases utilizadas no processamento de alimentos. Embora as lipases e fosfolipases comerciais tenham origem animal ou vegetal, as leveduras *C. cylindracea, C. rugosa, G. candidum, Sporidiobolus* spp., *T. beigeli* (atualmente *Trichosporon ovoides*), *G. fermentans*, e *Y. lipolytica* são fontes industriais dessas enzimas (Vakhlu e Kour, 2006; Borrelli e Trono, 2015).

4.6.2. Lipídeos

Embora há anos se conheça a capacidade dos micro-organismos de armazenar lipídeos, apenas recentemente os estudos bioquímicos relacionados com essa produção foram realizados (Beopoulos *et al.*, 2009). Apenas algumas leveduras possuem a capacidade de armazenar lipídeos em níveis superiores a 20% do seu peso seco celular. Dentre essas leveduras destacam-se as dos gêneros *Yarrowia, Rhodotorula, Rhodosporidium, Cryptococcus, Trichosporon* e *Lipomyces* (Ageitos *et al.*, 2011)

De forma geral, os lipídeos são acumulados em depósitos globulares de gordura bem discretos e podem estar associados a algumas organelas celulares. O interesse da indústria por esses lipídeos se deve às

propriedades físico-químicas e bioquímicas destes compostos e no fato de os micro-organismos serem capazes de acumular lipídeos na forma de triglicerídeos ricos em ácidos graxos poliinsaturados (Papanikolaou *et al.,* 2001). Das espécies de leveduras descritas, apenas alguns gêneros mostraram-se capazes de acumular lipídeos em níveis superiores a 25% do seu peso seco (Beopoulos *et al.,* 2009). Dentre esses gêneros destacam-se as espécies: *Cryptococcus albidus*, *Lipom*yces *lipofer*, *Lipomyces starkeyi*, *Rhodosporidium toruloides*, *Rhodotorula glutinis* (atualmente *Rhodosporidium glutinis*), *Trichosporon pullulans* (atualmente *Tausonia pullulans*) e *Yarrowia lipolytica* (Li *et al.,* 2008).

4.6.3. Carotenoides

Os carotenoides são corantes naturais, variando entre o amarelo e o vermelho. Exercem grande influência na aceitação de muitos alimentos, são precursores de vitamina A e estão relacionados entre os compostos físico-químicos atuantes na redução dos riscos de doenças degenerativas como o câncer e doenças cardiovasculares (Maldonade, 2008). Esses compostos são solúveis em lipídeos e a maioria atua como antioxidantes e na eliminação de radicais superóxidos. Eles ocorrem naturalmente em sistemas fotossintéticos das plantas. Nos fungos os carotenoides são utilizados como pigmentos protetores em ambientes onde a luz é abundante (Mata-Gómes, 2014).

Devido ao benefício para a saúde humana e ao crescimento de algumas áreas, especialmente aquicultura e indústria avícola, o interesse nos carotenoides tem aumentado consideravelmente (Mata-Gómes *et al.*, 2014). Os valores relacionados com o mercado dos carotenoides em 2007 foram em torno de 766 milhões de dólares com estimativa de cerca de 919 milhões de dólares em 2015 (BCC Research, 2015). Os carotenoides de uso comercial são obtidos pela extração dos vegetais e por meio da síntese química (Coulson *et al.,* 1980). Devido às variações sazonais que podem afetar a extração desses compostos das plantas e pela toxicidade dos resíduos gerados pela síntese química, a obtenção de carotenoides a partir de micro-organismos tem aumentado consideravelmente. Este aumento é devido ao baixo custo de produção e à segurança do uso (Johnson *et al.,* 1996).

A presença dos carotenoides em bactérias, algas e fungos é ampla e a produção microbiana para fins comerciais apresenta-se altamente eficiente pela facilidade de manuseio de todo o processo (De Haan *et al.,* 1991). Em leveduras há algumas espécies conhecidas como produtoras de carotenoides. Entre estas destacam-se espécies do gênero *Rhodotorula*: *Rhodotorula glutinis, Rhodotorula minuta* (atualmente *Cystobasidium minuta*),

Rhodotorula mucilaginosa, Rhodotorula acheniorum (atualmente *Farysia acheniorum*) e *Rhodotorula graminis* (atualmente *Rhodosporidium graminis*) (Tinoi *et al.*, 2005). O carotenoide mais importante produzido por leveduras é a astanxantina, presente na espécie *Xanthophyllomyces dendrorhous* (=*Phaffia rhodozyma*). Este composto é utilizado para dar a cor típica da carne de salmão, produzido em cativeiro. O peixe produzido em cativeiro não apresenta a coloração salmão, o que pode ser obtido pela adição deste carotenoide na ração.

4.6.4. Compostos aromáticos

Os compostos aromáticos são caracterizados pela alta volatilidade e capacidade de interagirem com os receptores olfativos e pertencem a diversas classes químicas (álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres, lactonas, terpenos e compostos de enxofre) (Wheatley *et al.*, 2002). A produção de alguns desses compostos tem sido relatada em leveduras das espécies *Geotrichum candidum, S. cerevisiae* e *Y. lipolytica* (Spinnler *et al.*, 2001). Uma série de trabalhos tem voltado a atenção para estes compostos, resultantes do metabolismo celular, que são liberados pela célula em condições normais, como gases em alta pressão de vapor (Tarkka e Piechulla, 2007). Recentemente, os compostos orgânicos voláteis têm sido empregados no controle de fitopatógenos. Em um estudo com seis linhagens de *S. cerevisiae* isoladas de processo fermentativo para produção de etanol, foi relatado o potencial fungistático dos compostos voláteis produzidos por estas leveduras. Neste trabalho a ação dos compostos foi capaz de inibir o crescimento de *Guignardia citricarpa*, agente causal da pinta preta em citro (Fialho *et al.*, 2010)

4.7. Leveduras como probióticos

Os probióticos podem ser definidos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Para ser utilizado como probiótico o micro-organismo tem que ser resistente à acidez gástrica, aos ácidos biliares e às enzimas digestivas; deve ser capaz de se proliferar no intestino; precisa ser considerado seguro para o hospedeiro e os efeitos benéficos de seu consumo devem ser comprovados em estudos *in vivo* (Vandenplas *et al.*, 2015). Os probióticos têm sido utilizados principalmente para prevenir e tratar distúrbios gastrointestinais, embora nos últimos anos tenham sido utilizados no tratamento de outras patologias, como alergias e dermatites. Dentre as leveduras, a espécie mais utilizada como probiótico tem sido uma linhagem de *S. cerevisiae*, conhecida como *Saccharomyces boulardii* (Moré e Swidsinski, 2015). Essa linhagem foi originalmente isolada a partir de frutas na Indochina e tem sido utilizada para o tratamento de doenças intestinais em crianças e adultos desde 1950 (Buts e Bernasconi, 2005; Edwards-Ingram *et al.*, 2007). Sua ação é baseada em múltiplos mecanismos, incluindo o estímulo do sistema imunológico; efeito anti-inflamatório e antisecretório; efeito prebiótico, estimulando a regeneração e estabelecimento da microbiota saudável; proteção contra os patógenos e suas toxinas e regeneração das células do epitélio intestinal (Moré e Swidsinski, 2015).

Evidências preliminares indicam que algumas leveduras podem produzir prebióticos, que são compostos (geralmente oligossacarídeos) que estimulam o crescimento das bifidobactérias e outras bactérias benéficas no intestino de humanos e animais. Foi constatado que *K. lactis* sintetiza oligossacarídeos prebióticos e peptídeos imunoestimulantes. Uma pesquisa de leveduras isoladas a partir de frutas e flores em florestas tropicais brasileiras mostrou que isolados de *Candida, Rhodotorula* e *Cryptococcus* produziram quantidades substanciais de fruto-oligossacarídeos (Maugeri e Hernalsteens, 2007). O efeito prebiótico do *S. boulardii* é devido à composição de sua parede celular, que é composta por glucanos e manoproteínas, que servem como excelente substrato para o metabolismo microbiano, levando à produção de compostos benéficos, como o butirato (Moré e Swidsinski, 2015).

4.8. Leveduras como agentes de biorremediação

Biorremediação é um processo no qual organismos vivos ou suas enzimas são utilizados para remover ou reduzir poluentes no ambiente (Borém e Giúdice, 2008). Devido à capacidade de várias espécies de leveduras de crescer em uma grande diversidade de substratos, incluindo moléculas aromáticas, alcanos, compostos lipídicos, aminas e outros compostos recalcitrantes, elas têm a capacidade de transformar compostos tóxicos em derivados inócuos (Kurtzman *et al.*, 2011).

A degradação de poluentes derivados de petróleo tem sido relatada por algumas leveduras, tais como *Candida tropicalis*, *Cryptococcus laurentii*, *Trichosporon asahii*, *Rhodotorula mucilaginosa* e *Candida rugosa* (Chandran *et al.*, 2012). *Candida tropicalis* e *T. asahii* são capazes de produzir biosurfactantes, os quais são amplamente utilizados para biorremediação porque auxiliam no crescimento de micro-organismos sobre a superfície hidrofóbica (Chandran *et al.*, 2012). Leveduras do gênero *Saccharomyces*, *Candida* e *Pichia* têm sido utilizadas como biossorvente para remoção de metais pesados. A maioria das leveduras pode sorver uma vasta gama de metais, ou ser estritamente específica em relação a um íon específico (Podgorskii *et al.*, 2004; Wang e Chen, 2008). A levedura *Y. lipolytica* também tem sido objeto de vários estudos relacionados com os processos de biorremediação, como na absorção de metais pesados, devido à resistência desta levedura aos metais Cádmio, Níquel, Cobalto e Zinco (Liu *et al.*, 2015).

A degradação de compostos fenólicos é observada em vários gêneros de leveduras, particularmente basidiomicetos tais como *Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*. Estas espécies são reconhecidas por degradar eficientemente compostos aromáticos halogenados, além de hidrocarbonetos aromáticos policíclicos de sedimentos costeiros (Margesin, 2007). Tem sido relatado ainda que a *Pseudozyma jejuensis* (atualmente *Langdonia jejuensis*) é capaz de degradar certos resíduos de plástico (Seo *et al.*, 2007). A degradação de micotoxinas por leveduras também já foi observada, por exemplo, *Xanthophyllomyces dendrorhous* e espécies de *Trichosporon* degradam ocratoxina, uma micotoxina potente, e linhagens de *S. cerevisiae* são capazes de degradar a patulina, que também é uma micotoxina, durante fermentações de cidra (Péteri *et al.*, 2007; Bryden, 2007).

Outro grande problema para o meio ambiente é a emissão de corantes sintéticos. Pelo fato de não serem biodegradáveis, os tratamentos físicos e químicos desses corantes têm levado à produção de substâncias tóxicas. A abordagem que permite a solução do problema sem prejuízo para o meio ambiente seria a utilização de micro-organismos. A espécie *Geotrichum candidum* já foi mostrada como capaz de degradar 21 corantes industriais. Esta atividade ampla foi atribuída à presença de uma peroxidase extracelular de 60 Kda (Kim e Shoda, 1999). Porém, a descoloração e a degradação de corantes por leveduras não tem sido estudada com grande intensidade. A biossorção de corantes têxteis foi relatada com a utilização da levedura *Kluyveromyces marxianus* IMB3. Esta espécie também foi capaz de degradar o corante Remazol utilizado na indústria têxtil. *Rhodotorula rubra* foi capaz de degradar o corante cristal violeta em apenas quatro dias (Buzzini e Vaughan-Martini, 2006). Nestes últimos anos, a atividade de descoloração de corantes das espécies *Debaryomyces polymorphus, Kluyveromyces marxianus, Rhodotorula mucilaginosa, Candida zeylaoides, Meyerozyma guilliermondi, C. tropicalis* e *Saccharomyces cerevisiae* foi relatada na literatura (Srinivasan *et al.*, 2010).

4.9. Leveduras como agentes de expressão heteróloga de proteínas

Entende-se por expressão heteróloga a produção de proteínas recombinantes de origem exógena (de outros organismos). A partir dos anos 1980, o uso de leveduras para a produção de proteínas heterólogas tem sido relatado (Gellissen *et al.*, 2005). O evento marcante do processo de expressão de proteínas heterólogas nestes micro-organimos foi a clonagem, expressão, processamento e excreção da pró--insulina humana em *S. cerevisiae*, no ano de 1980 (Cousens *et al.*, 1987).

A insulina obtida a partir de células de *S. cerevisiae* possui efeitos colaterais reduzidos e alta eficácia farmacológica quando comparada com a insulina obtida a partir de suínos. A eficiência de *S. cerevisiae* em sintetizar e secretar α-interferon, fator de crescimento epidérmico, antígeno de superfície da hepatite B, β-endorfina e proquimosina é mostrada em vários estudos (Hadfield *et al.*, 1993; Gellissen *et al.*, 2005).

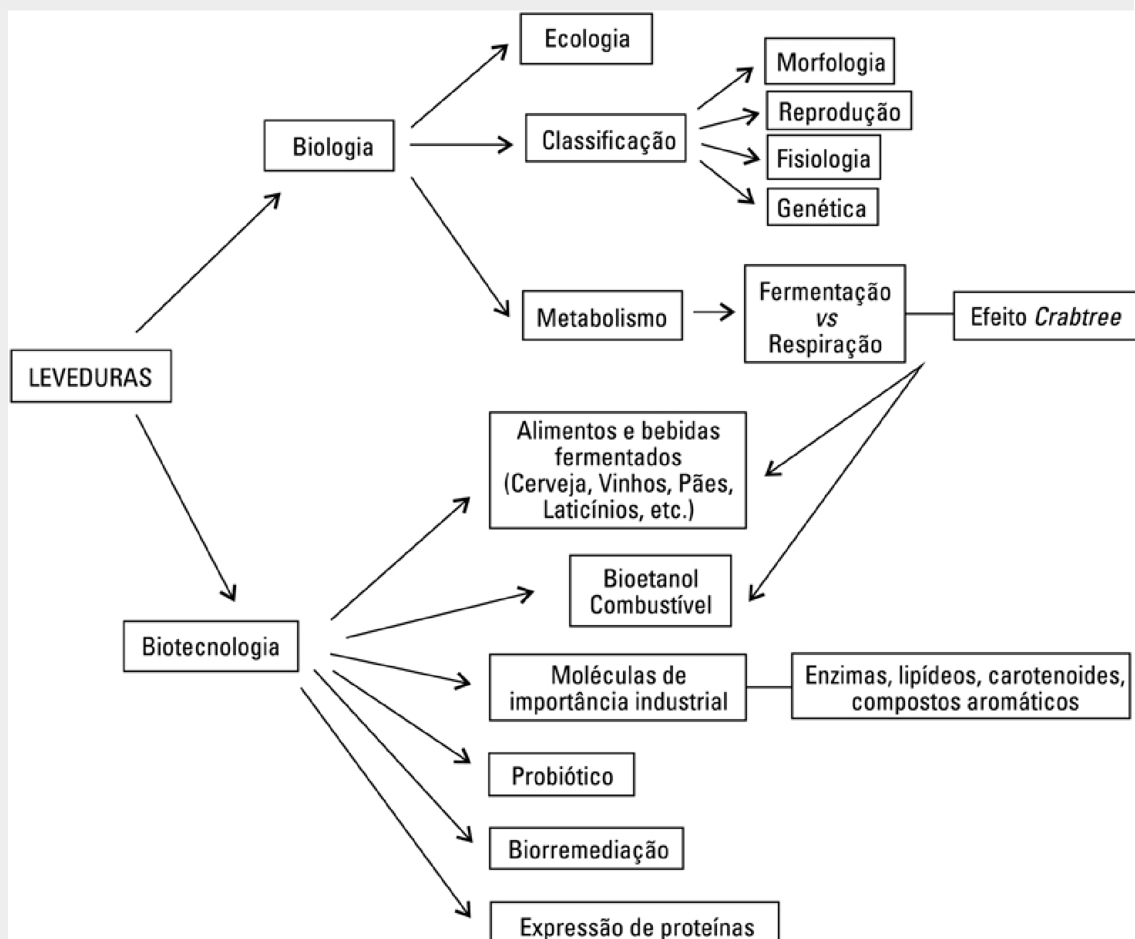
Várias vantagens conferem às leveduras esta eficiência na produção de proteínas nativas e heterólogas. Dentre estas pode-se citar: a) facilidades de crescimento e manipulação genética; b) elevada expressão em sistemas otimizados; c) capacidade de executar a remoção de íntrons durante o processamento de RNA e d) capacidade de executar o processamento das proteínas (Gellissen *et al.*, 2005).

Além de *S. cerevisiae* diversas outras leveduras têm sido estudadas com o objetivo de sintetizar proteínas heterólogas. Dentre estas destacam-se: *S. pombe, K. lactis, Y. lipolytica, Z. rouxii, Z. bailii e Arxula adeninivorans* (Bóer *et al.*, 2007; Gellissen *et al.*, 2005; van Ooyen *et al.*, 2006), e *Komagataella pastoris, Ogataea polymorpha, C. boidinii, O. methanolica, e Schwanomyces occidentalis* (Bóer *et al.*, 2007; Labuschagne e Albertyn, 2007). As espécies mais extensivamente estudadas e desenvolvidas têm sido *S. cerevisiae e K. pastoris*. Esta última tem mostrado eficiência na produçao de mais de 500 proteínas heterólogas, incluíndo proteínas de animais, humanos e plantas. Esta eficiência é resultado da capacidade desta levedura em produzir grandes quantidades de proteínas, modificá-las de acordo com os padrões das proteínas humanas, secretá-las de forma eficiente para o meio evitando sua agregação e degradação durante o processo de recuperação das proteínas produzidas (Daly e Hearn, 2005). *Saccharomyces cerevisiae* por sua vez, embora não tenha as vantagens de maiores expressão e secreção de proteínas heterólogas observadas em *K. pastoris*, tem sido utilizada na

indústria farmacêutica e para produção de vacinas. Isto ocorre devido à grande compreensão da sua fisiologia, além do conhecimento dos sistemas genéticos relacionados com os processos de clonagem e expressão (Buzzini e Vaughan-Martini, 2006).

Revisão dos conceitos apresentados

Mapa conceitual representando o conjunto de ideias e os principais conceitos abordados no capítulo, e como estes temas se conectam.



Questões

1. Descreva o efeito *Crabtree* e discuta sobre sua influência no processo de produção de etanol.
2. Com relação ao processo de identificação de leveduras, discuta o que mudou com o advento das técnicas de biologia molecular.

3. Descreva os principais atributos das leveduras utilizados para seleção de espécies e linhagens para aplicação em processos industriais de produção de alimentos e bebidas. Cite exemplos das vantagens do uso de levedura(s) selecionada(s) para produção de determinado produto.
4. Discuta a importância da busca e descrição de novas espécies e linhagens de leveduras em termos biotecnológicos.
5. De acordo com a literatura, sabemos que algumas leveduras possuem alta eficiência na expressão de proteínas heterólogas. Discuta o motivo pelo qual a indústria farmacêutica tem utilizado a espécie *Saccharomyces cerevisiae*.
6. A emissão de corantes pela indústria têxtil no ambiente é um grave problema. Os métodos químicos e físicos utilizados no tratamento desses corantes podem gerar substâncias tóxicas que são também prejudiciais. Baseado no que foi tratado neste capítulo, qual seria, portanto, uma maneira de solucionar este problema? Busque na literatura exemplos relacionados com o assunto.

Tópicos para discussão

A capacidade de realizar a fermentação e produzir enzimas e outros compostos como lipídeos e carotenóides faz com que as leveduras estejam presentes em nosso dia-a-dia, sendo utilizadas em diversos processos industriais. Entretanto, algumas vezes essas mesmas características podem ter um carácter nocivo em determinados produtos ou ambientes. Discuta em que situações (industriais, ambientais e em questões relacionadas à saúde de humanos, plantas e animais) a presença das leveduras é indesejável e de que maneira seu crescimento pode ser evitado ou controlado.

Sugestões para pesquisa

-Fabricando rosca caseira

Ingredientes:

1 e {1/2} copo de açúcar
{1/2} copo de óleo
9 ovos
1 litro de leite
100g de fermento biológico (leveduras)
2 e {1/2} kg de farinha de trigo
3 colheres de manteiga

Primeiro misture o fermento, os ovos, o açúcar, o óleo e o leite morno. Aos poucos vá acrescentando a farinha de trigo.

Separe parte da massa e não coloque o fermento, para observar a diferença entre a rosca feita com e sem as leveduras!!

Depois de sovada a massa, enrole as roscas e as deixe em repouso por mais ou menos 30 minutos.

Observe: O que aconteceu com as roscas feitas sem o fermento? E com as roscas que levaram fermento na massa?

Discuta: Porque isso ocorreu?

Qual a função do fermento na fabricação da rosca?

Porque o açúcar é importante nesse processo?

Porque o leite é acrescentado ainda morno?

Referências

Addis E, Fleet GH, Cox JM, Kolak D, Leung T. The growth, properties and interactions of yeasts and bacteria associated with the maturation of Camembert and blue-veined cheeses. *Int J Food Microbiol*. 2001;69:25–36.

Aehle, W. 2004. Enzymes in Industry. Production and Applications, 2nd ed. Wiley VCH, Weinheim. In : Kurtzman, C., Fell, J.W., Boekhout, T., (eds.), 2011. The yeasts: a taxonomic study. Elsevier Inc.

Ageitos JM, Vallejo JA, Veiga-Crespo P, Villa TG. Oily yeasts as oleaginous cell factories. *Applied microbiology and biotechnology*. 2011;90(4):1219–1227.

Aidoo KE, Nout MJR, Sarkar PK. Occurrence and function of yeasts in Asian indigenous fermented foods. *FEMS Yeast Res*. 2006;6:30–39.

Bacus J. *Utilization of Microorganisms in Meat Processing*. Letchworth: Research Studies Press; 1984.

Badotti F, Vilaça ST, Arias A, Rosa CA, Barrio E. Two interbreeding populations of Saccharomyces cerevisiae strains coexist in cachaça fermentations from Brazil. *FEMS Yeast Research*. 2014;14(2):289–301.

Bankar AV, Kumar AR, Zinjarde SS. Removal of chromium (VI) ions from aqueous solution by adsorption onto two marine isolates of *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Hazardous Materials*. 2009;170(1):487–494.

Barnett JA. A history of research on yeasts 2: Louis Pasteur and his contemporaries. *Yeast*. 2000;16:755–771.

Basso LC, de Amorim HV, de Oliveira AJ, Lopes ML. Yeast selection for fuel ethanol production in Brazil. *FEMS Yeast Research*. 2008;8(7):1155–1163.

Borém A, Giúdice MPD. *Biotecnologia e meio ambiente*. 2ª ed. Viçosa: Ed. Suprema; 2008.

BCC Research: The global market for carotenoids. 2015. Disponível em: http://www.bccresearch.com/market-research/food-and-beverage/carotenoids-market-fod025c.html. Acesso em setembro de 2015.

Beopoulos A, Cescut J, Haddouche R, Uribelarrea JL, Molina-Jouve C, Nicaud JM. *Yarrowia lipolytica* as a model for bio-oil production. *Progress in Lipid Research*. 2009;48(6):375–387.

Bhattarai K, Stalick WM, Mckay S, Geme G, Bhattarai N. Biofuel: an alternative to fossil fuel for alleviating world energy and economic crises, Journal of Environmental Science and Health. *Part A*. 2011;46:1424–1442.

Blasco L, Viñas M, Villa TG. Proteins influencing foam formation in wine and beer: the role of yeast. *Int Microbiol*. 2001;14:61–71.

Böer E, Steinborn G, Kunze G, Gellissen G. Yeast expression platforms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2007;77(3):513–523.

Bokulich NA, Ohta M, Lee M, Mills DA. Indigenous bacteria and fungi drive traditional kimoto sake fermentations. *Appl Environ Microbiol*. 2014;80:5522–5529.

Bonjean B, Guillaume LD. Yeasts in bread and baking products. In: Boakhout T, Robert V, eds. *Yeast in Food Beneficial and Detrimental Aspects*. Hamburg: Behis-Verlag; 2003:289–307.

Boutrou R, Guéguen M. Interests in *Geotrichum candidum* for cheese technology. *Int J Food Microbiol*. 2005;102:1–20.

Brandt MJ. Starter cultures for cereal based foods. *Food Microbiol*. 2014;37:41–43.

Bryden WL. Mycotoxins in the food chain: human health implications. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2007;16:95–101.

Buts J-P, Bernasconi P. *Saccharomyces boulardii*: basic science and clinical applications in gastroenterology. *Gastroenterology Clinics of North America*. 2005;34(3):515–532.

Buzzini, P.; Vaughan-Martini, A. 2006. Yeast biodiversity and biotechnology. In: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 533-59.

Cadete, R.M.; Fonseca, C.; Rosa, C.A. 2014. Novel Yeast Strains from Brazilian Biodiversity: Biotechnological Applications in Lignocellulose Conversion into Biofuels. In: Biofuels in Brazil. Springer International Publishing, p. 255-79.

Campbell-Platt G, Cook PE. *Fermented Meats*. London: Blackie Academic & Professional; 1995.

Cardoso VM, Borelli BM, Lara CA, Soares MA, Pataro C, Bodevan EC, Rosa CA. The influence of seasons and ripening time on yeast communities of a traditional Brazilian cheese. *Food Research International*. 2015;69:331–340.

Carrau F, Gaggero C, Aguilar PS. Yeast diversity and native vigor for flavor phenotypes. *Trends Biotechnol*. 2015;33:148–154.

Carrasco M, Rozas JM, Barahona S, Alcaíno J, Cifuentes V, Baeza M. Diversity and extracellular enzymatic activities of yeasts isolated from King George Island, the sub-Antarctic region. *BMC Microbiology, v.* 2012;12(1):251.

Cavanagh D, Fitzgerald GF, McAuliffe O. From field to fermentation: the origins of *Lactococcus lactis* and its domestication to the dairy environment. *Food Microbiol*. 2015;47:45–61.

Chandran P, Das N. Role of sophorolipid biosurfactant in degradation of diesel oil by Candida tropicalis. *Bioremed J*. 2012;16:19–30.

Clemente-Jimenez JM, Mingorance-Cazorla L, Martinez-Rodriguez S, Las Heras-Vázquez FJ, Rodriguez-Vico F. Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *Int J Food Microbiol*. 2005;98:301–308.

Cocolin L, Dolci P, Rantsiou K. Biodiversity and dynamics of meat fermentations: the contribution of molecular methods for a better comprehension of a complex ecosystem. *Meat Sci*. 2011;89:296–302.

Coulson, J. 1980. Miscellaneous naturally occurring colouring materials for foodstuff. Developments in food colour. Applied Science, London, p. 189-218. In: Mata-Gómez, Luis Carlos et al. 2014. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. Microbial cell factories, 13(1): 12.

Cousens LS, Shuster JR, Gallegos C, Ku L, Stempien MM, Urdea MS, Tekamp-Olson P. High level expression of proinsulin in the yeast, Saccharomyces cerevisiae. *Gene*. 1987;61(3):265–275.

Cunha-Pereira F, Hickert LR, Sehnem NT, de Souza-Cruz PB, Rosa CA, Ayub MAZ. Conversion of sugars present in rice hull hydrolysates into ethanol by *Spathaspora arborariae*, *Saccharomyces cerevisiae*, and their co-fermentations. *Bioresour Technol*. 2011;102:4218–4225.

Daly R, Hearn MTW. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. *Journal of Molecular*

Recognition. 2005;18(2):119–138.

Daniel H-M, Lachance M-A, Kurtzman CP. On the reclassification of species assigned to *Candida* and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2014;106(1):67–84.

Das S, Holland R, Crow VL, Bennett RJ, Manderson GJ. Effect of yeast and bacterial adjuncts on the CLA content and flavour of a washed-curd, dry-salted cheese. *Int Fairy J*. 2005;15:807–815.

Dashko S, Zhou N, Compagno C, Piškur J. Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Research*. 2014;14(6):826–832.

De Haan A, Burke R, Bont J. Microbial production of food colorants. *Med Fac Landbouww Rijisuniv Gent*. 1991;56:1655–1660.

De Vuyst L, Van Kerrebroeck S, Harth H, Huys G, Daniel HM, Weckx S. Microbial ecology of sourdough fermentations: diverse or uniform? *Food Microbiol*. 2014;37:11–29.

Deak, T. 2009. Ecology and biodiversity of yeasts with potential value in biotechnology. In: Yeast Biotechnology: Diversity and Applications, Springer, Netherlands, p. 151-68.

Deak, T. 2006. Environmental factors influencing yeasts. In: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Springer, Berlin, Heidelberg, p. 155-74.

Decock P, Cappelle S. Bread technology and sourdough technology. *Trends Food Sci Technol*. 2005;16:113–120.

Dufour, J.; Verstrepen, K.; Derdelinckx, G. 2003. Brewing yeasts. In: Yeasts in Food, Beneficial and Detrimental Aspects. Behr's Verlag, Hamburg, p. 347-88.

Edwards-Ingram L, Gitsham P, Burton N, Warhurst G, Clarke I, Hoyle D, Stateva L. Genotypic and physiological characterization of Saccharomyces boulardii, the probiotic strain of Saccharomyces cerevisiae. *Applied and Environmental Microbiology*. 2007;73(8):2458–2467.

Esteve-Zarzoso B, Fernandez-Espinar MT, Querol A. Authentication and identification of Saccharomyces cerevisiae 'flor' yeast races involved in sherry ageing. *Antonie van Leeuwenh*. 2004;85:151–158.

Ferreira AD, Viljoen BC. Yeasts as adjunct starters in matured Cheddar cheese. *Int J Food Microbiol*. 2003;86:131–140.

Fialho MB, Toffano L, Pedroso MP, Augusto F, Pascholati SF. Volatile organic compounds produced by Saccharomyces cerevisiae inhibit the in vitro development of Guignardia citricarpa, the causal agent of citrus black spot. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. 2010;26(5):925–932.

Fisk DG, Ball CA, Dolinski K, Engel SR, Hong EL, Issel-Tarver L, Schwartz K, Sethuraman A, Botstein D, Cherry JM. *Saccharomyces cerevisiae* S288C genome annotation: a working hypothesis. *Yeast*. 2006;23:857–865.

Fleet, G.H. 1997. The microbiology of alcoholic beverages. In: Microbiology of Fermented Foods, Springer, US, 217-62.

Fleet GH, Wine. *In: Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. 3rd ed Washington, D.C: ASM Press; 2001.

Fleet GH. Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol*. 2003;86:11–22.

Gellissen G, Kunze G, Gaillardin C, Cregg JM, Berardi E, Veenhuis M, Klei I. New yeast expression platforms based on methylotrophic *Hansenula polymorpha* and *Pichia pastoris*

and on dimorphic *Arxula adeninivorans* and *Yarrowia lipolytica*–a comparison. *FEMS Yeast Research.* 2005;5(11):1079–1096.

Hadfield C, Raina KK, Shashi-Menon K, Mount RC. The expression and performance of cloned genes in yeasts. *Mycological Research*. 1993;97(8):897–944.

Hammes WP, Brandt MJ, Francis KL, Rosenheim J, Seitter MF, Vogelmann S. Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends Food Sci Technol*. 2005;16:4–11.

Hickert LR, Souza-Cruz PBD, Rosa CA, Ayub MAZ. Simultaneous saccharification and co-fermentation of un-detoxified rice hull hydrolysate by *Saccharomyces cerevisiae* ICV D254 and *Spathaspora arborariae* NRRL Y-48658 for the production of ethanol and xylitol. *Bioresour Technol.* 2013;143:112–116.

Hou X. Anaerobic xylose fermentation by *Spathaspora passalidarum*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2012;94:205–214.

Howe P. Sparkling wine. In: Lea AGH, Piggott JR, eds. *Fermented Beverage Production*. 2nd ed New York: Kluwer Academic; 2003:139–156.

Ivey M, Massel M, Phister TG. Microbial interactions in food fermentations. *Annu Rev Food Sci Technol*. 2013;4:141–162.

Jemli S, Ayadi-Zouari D, Hlima HB, Bejar S. Biocatalysts: application and engineering for industrial purposes. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2014:1–13.

Johnson, E.A.; Schroeder, W.A. 1996. Microbial carotenoids. In: Downstream processing biosurfactants carotenoids. Springer Berlin Heidelberg. p. 119-178. In: Mata-Gómez, Carlos, L. et al. 2014. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. Microbial Cell Factories, 13(1): 12.

Kim SJ, Shoda M. Purification and characterization of a novel peroxidase from *Geotrichum candidum* Dec 1 involved in decolorization of dyes. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999;65(3):1029–1035.

Ko¨Tter P, Amore R, Hollenberg CP, Ciriacy M. Isolation and characterization of the *Pichia stipitis* xylitol dehydrogenase gene, *XYL2*, and construction of a xylose utilizing *Saccharomyces cerevisiae* transformant. *Curr Genet*. 1990;18:493–500.

Kumar A, Singh LK, Ghosh S. Bioconversion of lignocellulosic fraction of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicelluloses acid hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*. *Bioresource Technology*. 2009;100:3293–3297.

Kurtzman CP. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the Saccharomycetaceae, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*. *Vanderwaltozyma and Zygotorulaspora. FEMS Yeast Res*. 2003;4:233–245.

Kurtzman CP. Use of gene sequence analyses and genome comparisons for yeast systematics. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2014;64(Pt 2):325–332.

Kurtzman, C.P.; Fell, J.W. 2006. Yeast systematics and phylogeny—implications of molecular identification methods for studies in ecology. In: Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts. Springer Berlin Heidelberg, p. 11-30.

Kurtzman CP, Robnett CJ. Phylogenetic relationships among yeasts of the '*Saccharomyces* complex'determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Res*. 2003;3:417–432.

Kurtzman CP, Fell JW, Boekhout T, eds. *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier; 2011.

Labuschagne M, Albertyn J. Cloning of an epoxide hydrolase-encoding gene from *Rhodotorula mucilaginosa* and functional expression in *Yarrowia lipolytica*. *Yeast*. 2007;24(2):69–78.

Lachance MA. Yeast communities in a natural tequila fermentation. *Antonie van Leeuwenh*. 1995;68:151–160.

Lachance MA. The Phaff school of yeast ecology. *Int Microbiol*. 2003;6:163–167.

Lara CA, Santos RO, Cadete RM, Ferreira C, Marques S, Gírio F, Fonseca C. Identification and characterisation of xylanolytic yeasts isolated from decaying wood and sugarcane bagasse in Brazil. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2014;105(6):1107–1119.

Laughery, M.F.; Hunter, T.; Brown, A.; Hoopes, J.; Ostbye, T.; Shumaker, T.; Wyrick, J.J. 2015. New vectors for simple and streamlined CRISPR-Cas9 genome editing in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast. doi:10.1002/yea.3098.

Lea AGH, Piggott J, eds. *Fermented beverage production*. Springer Science & Business Media; 2012.

Lefevre F, Jarrin C, Ginolhac A, Auriol D, Nalin R. Environmental metagenomics: an innovative resource for industrial biocatalysis. *Biocatalysis and Biotransformation*. 2007;25(2–4):242–250.

Legras J-L, Medinoglu D, Cornuet J-M, Karst F. Bread beer and wine: *Saccharomyces* diversity reflects human history. *Mol Ecol*. 2007;16:2091–2102.

Leroy F, Verluyten J, de Vuyst L. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. *Int J Food Microbiol*. 2006;106:270–285.

Li Q, Du W, Liu D. Perspectives of microbial oils for biodiesel production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2008;80(5):749–756.

Liu H-H, Ji X-J, Huang H. Biotechnological applications of *Yarrowia lipolytica*: Past, present and future. *Biotechnology Advances*. 2015;33:1522–1546.

Liu HZ, Wang WM, Theelen B, Groenewald M, Bai FY, Boekhout T. Phylogeny of tremellomycetous yeasts and related dimorphic and filamentous basidiomycetes reconstructed from multiple gene sequence analyses. *Studies in Mycology*. 2015;81:1–26.

Long TM, Su YK, Headman J, Higbee A, Willis LB, Jeffries TW. Cofermentation of glucose, xylose, and cellobiose by the beetle-associated yeast *Spathaspora passalidarum*. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78:5492–5500.

Lopes MR, Morais CG, Kominek J, Cadete RM, Soares MA, Uetanabaro AP, Fonseca C, Lachance MA, Hittinger CT, Rosa CA. Genomic analysis and D-xylose fermentation of three novel *Spathaspora* species: *Spathaspora girioi* sp. nov., *Spathaspora hagerdaliae* f. a., sp. nov. and *Spathaspora gorwiae* f. a., sp. nov. *FEMS Yeast Res*. 2016;16(4):pii: fow044.

Maldonade IR, Rodriguez-Amaya DB, Scamparini ARP. Carotenoids of yeasts isolated from the Brazilian ecosystem. *Food Chemistry*. 2008;107:145–150.

Margesin R. Alpine microorganisms: Useful tools for low-temperature bioremediation. *J Microbiol*. 2007;45:281–285.

Martiniano SE, Philippini RR, Chandel AK, Rosa CA, Pagnocca FC, da Silva SS. Evaluation of rice bran extract as a nitrogen source for improved hemicellulosic ethanol production from sugarcane bagasse by new xylose-fermenting yeast strains isolated from Brazilian forests. *Sugar Tech*. 2013;16:1–8.

Mata-Gómez LC, Montañez JC, Méndez-Zavala A, Aguilar CN. Biotechnological production of carotenoids by yeasts: an overview. *Microbial Cell Factories*. 2014;13(1):12.

Maugeri F, Hernalsteens S. Screening of yeast strains for transfructosylating activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2007;49(1):43–49.

Mcgovern PE, Zhang J, Tang J, Zhang Z, Hall GR, Moreau RA, Nuñez A, Dutyrm ED, Richards MP, Wang C-S, Cheng G, Zhao Z, Wang C. Fermented beverages of pre-proto-historic China. *Proc Natl Acad Sci, USA*. 2004;101:17593–17598.

Minervini F, De Angelis M, Di Cagno R, Gobbetti M. Ecological parameters influencing microbial diversity and stability of traditional sourdough. *Int J Food Microbiol*. 2014;171:136–146.

Morais CG, Cadete RM, Uetanabaro APT, Rosa LH, Lachance MA, Rosa CA. D-xylose-fermenting and xylanase-producing yeast species from rotting wood of two Atlantic Rainforest habitats in Brazil. *Fungal Genetics and Biology*. 2013;60:19–28.

Morais CG, Lara CA, Marques S, Fonseca C, Lachance MA, Rosa CA. Sugiyamaella xylanicola sp. nov., a xylan-degrading yeast species isolated from rotting wood. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 2013;63(6):2356–2360.

Moré MI, Swidsinski A. Saccharomyces boulardii CNCM I-745 supports regeneration of the intestinal microbiota after diarrheic dysbiosis – a review. *Clinical and Experimental Gastroenterology*. 2015;11:237.

Moreira N, Mendes F, Hogg T, Vasconcelos I. Alcohols, esters and heavy sulphur compounds production by pure and mixed cultures of apiculate wine yeasts. *Int J Food Microbiol*. 2005;103:285–294.

Mortimer R, Polsinelli M. On the origins of wine yeast. *Res Microbiol*. 1999;150:199–204.

Neujahr, H.Y. 2006. Yeasts in biodegradation and biodeterioration processes. Yeast, biotechnology and biocatalysis. Marcel Dekker, New York, p. 321-48, 1989. In: Rosa, C. Biodiversity and ecophysiology of yeasts. Berlin: Springer.

Padilla B, Manzanares P, Belloch C. Yeast species and genetic heterogeneity within *Debaryomyces hansenii* along the ripening process of traditional ewes’ and goats’ cheeses. *Food Microbiol*. 2014;38:160–166.

Panke S, Held M, Wubbolts M. Trends and innovations in industrial biocatalysis for the production of fine chemicals. *Current Opinion in Biotechnology*. 2004;15(4):272–279.

Papanikolaou S, Chevalot I, Komaitis M, Aggelis G, Marc I. Kinetic profile of the cellular lipid composition in an oleaginous *Yarrowia lipolytica* capable of producing a cocoa-butter substitute from industrial fats. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2001;80(3–4):215–224.

Pataro C, Guerra JB, Petrillo-Peixto ML, Mendonca-Hagler LC, Linardi VR, Rosa CA. Yeast communities and genetic polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* strains associated with artisanal fermentation in Brazil. *J Appl Microbiol*. 2000;89:24–31.

Péteri Z, Téren J, Vágvölgyi C, Varga J. Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin- producing yeasts. *Food Microbiol*. 2007;24:205–210.

Podgorskii VS, Kasatkina TP, Lozovaia OG. Yeast-biosorbents of heavy metals. *Mikrobiolohichnyi Zhurnal*. 2004;66:91–103.

Poli JS, da Silva MAN, Siqueira EP, Pasa VM, Rosa CA, Valente P. Microbial lipid produced by *Yarrowia lipolytica* QU21 using industrial waste: A potential feedstock for biodiesel production. *Bioresource Technology*. 2014;161:320–326.

Premjet S, Pumira B, Premjet D. Determining the potential of inedible weed biomass for bio-energy and ethanol production. *BioResources*. 2013;8(1):701–716.

Pretorius IS. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*. 2000;16:675–729.

Rantsiou K, Cocolin L. New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods: a review. *Int J Food Microbiol*. 2006;108:255–267.

Raspor P, Milek DM, Polanc J, Možina SS, Cadež N. Yeasts isolated from three varieties of grapes cultivated in different locations of the Dolenjska vine-growing region, Slovenia. *Int J Food Microbiol*. 2006;109:97–102.

Reader HP, Dominiquez M. Fortified Wines Sherry, Port and Madeira. In: Lea AG, Piggott JR, eds. *Fermented Beverage Production*. 2nd ed New York: Kluwer Academic; 2003:157–194.

Renewable Fuels Association (RFA). World fuel ethanol production. 2015. Disponível em: http://ethanolrfa.org/pages/World-Fuel-Ethanol-Production. Acesso em setembro de 2015.

Robertson LA. The Delft School of Microbiology, the nineteenth to the twenty-first century. *Adv Appl Microbiol*. 2003;52:357–388.

Romano, P.; Capace, A.; Jespersen, L. 2006. Taxonomic and Ecological Diversity of Food and Beverage Yeasts. In: The Yeast Handbook-Yeasts in Food and Beverages. Heidelberg: Springer-Verlag Berlin, p. 13-53.

Romero AM, Mateo JJ, Maicas S. Characterization of an ethanol-tolerant 1, 4-β-xylosidase produced by Pichia membranifaciens. *Letters in Applied Microbiology*. 2012;55(5):354–361.

Roostita R, Fleet GH. The occurrence and growth of yeasts in Camembert and blue-veined cheeses. *Int J Food Microbiol*. 1996;28:393–404.

Samelis, J.; Sofos, J.N. 2003. Yeasts in meat and meat products. In: Yeasts in Food, Beneficial and Detrimental Aspects. Hamburg: Behr's Verlag, p. 239-65.

Schifferdecker AJ, Dashko S, Ishchuk OP, Piškur J. The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. *Yeast*. 2014;31:323–332.

Seo H-S, Um H-J, Min J, Rhee S-K, Cho TJ, Kim Y-H, Lee J. Pseudozyma jejuensis sp. nov., a novel cutinoly- tic yeast species that is able to degrade plastic waste. *FEMS Yeast Res*. 2007;7:1035–1045.

Shinde NR, Bankar AV, Kumar AR, Zinjarde SS. Removal of Ni (II) ions from aqueous solutions by biosorption onto two strains of *Yarrowia lipolytica*. *Journal of Environmental Management*. 2012;102:115–124.

Spinnler HE, Berger C, Lapadatescu C, Bonnarme P. Production of sulfur compounds by several yeasts of technological interest for cheese ripening. *International Dairy Journal*. 2001;11(4):245–252.

Srinivasan A, Viraraghavan T. Decolorization of dye wastewaters by biosorbents: a review. *Journal of Environmental Management*. 2010;91(10):1915–1929.

Starmer WT, Lachance MA. *Yeast ecology, The yeast: a taxonomic study*. 5th ed. Burlington, MA: Elsevier; 2011: P. 82.

Steinkraus KH, ed. *Industrialization of Indigenous Fermented Foods*. 2nd ed New York: Marcel Dekker; 2004.

Strouhal M, Kizek R, Vacek J, Trnková L, Němec M. Electrochemical study of heavy metals and metallothionein in yeast *Yarrowia lipolytica*. *Bioelectrochemistry*. 2003;60(1):29–36.

Tamang, J.P.; Fleet, G.H. 2009. Yeasts diversity in fermented foods and beverages. In: Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. Netherlands: Springer, p. 169-98.

Tanokura M, Miyakawa T, Guan L, Hou F. Structural analysis of enzymes used for bioindustry and bioremediation. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 2015;79:1391–1401.

Tarkka MT, Piechulla B. Aromatic weapons: truffles attack plants by the production of volatiles. *New Phytologist*. 2007;175(3):381–383.

Tinoi J, Rakariyatham N, Deming RL. Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochemistry*. 2005;40(7):2551–2557.

Ulber R, Soyez K. From wine to penicillin – 5000 years of biotechnology. *Chemie Unser Zeit*. 2004;38:172–180.

Vandenplas Y, Huys G, Daube G. Probiotics: an update. *Jornal de Pediatria (versão em português)*. 2015;91(1):6–21.

Van Ooyen AJ, Dekker P, Huang M, Olsthoorn M, Jacobs DI, Colussi PA, Taron CH. Heterologous protein production in the yeast *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research*. 2006;6(3):381–392.

Verstrepen KJ, Chambers PJ, Pretorius IS. The development of superior yeast strains for the food and beverage industries: challenges, opportunities, and potential benefits. In: A. Querol A, Fleet GH, eds. *Yeasts in Foods and Beverages*. Berlin: Springer-Verlag; 2006:399–444.

Villarruel G, Rubio DM, Lopez F, Cintioni J, Gurevech R, Romero G, Vandenplas Y. *Saccharomyces boulardii* in acute childhood diarrhoea: a randomized, placebo-controlled study. *Acta Paediatrica*. 2007;96(4):538–541.

Watson DC. *Spirits*. Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry; 1993.

Wang J, Chen C. Biosorbents for heavy metals removal and their future. *Biotechnology Advances*. 2008;27:195–226.

Wheatley RE. The consequences of volatile organic compound mediated bacterial and fungal interactions. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2002;81(1–4):357–364.

CAPÍTULO 5

Micro-Organismos Fotossintéticos: Microalgas

Maria Isabel Queiroz

Leila Queiroz Zepka

Eduardo Jacob-Lopes

Conceitos apresentados neste capítulo

Este capítulo discute os aspectos relacionados com a aplicação industrial de micro-organismos fotossintéticos, com ênfase em microalgas. Serão abordados os fundamentos da morfologia, fisiologia e metabolismo de microalgas, os sistemas de cultivo e as principais aplicações tecnológicas das microalgas.

5.1. Introdução

A diversidade de seres que compõem o universo biológico que assola o planeta é simplesmente deslumbrante. Não menos deslumbrante que o todo, sem dúvida, é cada unidade em especial, ainda que em muitos aspectos possa ser similar morfo e fisiologicamente aos demais. Independente do padrão específico de síntese proteica de cada organismo, todos realizam transformações químicas, com suas devidas diferenças metabólicas, que despertam potencial interesse biotecnológico.

Das múltiplas diversidades metabólicas, vêm se destacando sob o ponto de vista biotecnológico os micro-organismos fotossintéticos, em especial as microalgas. Microalgas são organismos fotossintéticos com altas taxas de crescimento, que podem converter a energia solar em energia química através da fixação de dióxido de carbono. Esta terminologia engloba uma variedade de organismos procarióticos ou eucarióticos, autótrofos e muitos capazes de se desenvolverem heterotroficamente, tais como as cianobactérias.

As cianobactérias são micro-organismos procariontes, eubactérias Gram-negativas, largamente distribuídas na natureza e que apresentam como principal modelo metabólico a fotossíntese, da mesma forma que as algas eucarióticas e plantas superiores. No entanto, também apresentam em algumas linhagens a capacidade de crescer no escuro, obtendo energia através de substratos orgânicos como fontes de carbono. Evolutivamente, as cianobactérias representam um elo entre bactérias e plantas verdes.

As microalgas vêm sendo consideradas organismos promissores para várias aplicações biotecnológicas em função de seu potencial de uso para diversas formas renováveis de substâncias úteis tanto para alimentação humana como para produtos farmacêuticos, biofertilizantes, produção de energia química, entre outras aplicações. Neste sentido, são fontes geradoras de biomassa que podem complementar as culturas agrícolas para atender a crescente demanda global por alimentos, biocombustíveis e produção de compostos químicos.

Atualmente, estes micro-organismos vêm sendo cultivados visando à produção de *commodities*, além de produtos de alto valor agregado, como proteínas, óleos, polissacarídeos, ácidos graxos e pigmentos. Num futuro próximo espera-se que o mercado especializado para os bioprodutos de microalgas expanda-se significativamente. Estes micro-organismos são considerados matéria-prima em potencial para a produção de

biocombustíveis, com previsão de que desempenhem importante papel no setor de energia renovável.

Nos últimos anos cresceu notadamente o interesse pelo tratamento de águas residuárias por microalgas, com foco não só na solução de crises energéticas como também na aplicação de formas renováveis de biocombustíveis e no desenvolvimento de novas tecnologias que proporcionem a utilização de biomoléculas. No entanto, é consenso entre os pesquisadores que o aproveitamento de compostos celulares só é previsto como economicamente viável, se a totalidade das frações microalgais for valorada em uma estratégia de biorrefinaria. A biorrefinaria, como processo totalmente integrado, intensivo e multifuncional, aplica uma gama diversificada de matérias-primas para, de forma sustentável e simultânea, gerar diferentes produtos.

5.2. Aspectos morfofisiológicos e estruturais das microalgas

A caracterização morfológica, fisiológica e estrutural das microalgas torna estes organismos seres de extraordinária capacidade adaptativa, passíveis de sobreviverem em ambientes diversos. O termo morfologia tem por fim descrever a forma, tamanho e crescimento de um organismo. As microalgas não são altamente adaptáveis só sob o aspecto fisiológico, mas também são portadoras de uma morfologia bastante diversa. Principalmente no que diz respeito ao tamanho destes micro-organismos, os caracteres fisiológicos são fatores determinantes e estão diretamente ligados a sua estrutura celular.

Sob a denominação de microalgas incluem-se organismos de dois tipos de estrutura celular: a estrutura eucariótica, unidade estrutural de todos vegetais e animais, e vários grupos de protistas como fungos, protozoários e a maioria das algas; e a estrutura procariótica, que inclui as bactérias e duas divisões de microalgas (Cyanophyta e Prochlorophyta). De acordo com van den Hoek *et al.* (1995), as microalgas eucarióticas apresentam representantes nas divisões: Chlorophyta, Euglenophyta, Rhodophyta, Haptophyta, Heterokontophyta, Cryptophyta e Dinophyta. É importante salientar, no contexto desta obra, que a divisão *Chrysophyta* em alguns sistemas de classificação é incorporada ou substituída por Heterokontophyta.

As microalgas são altamente diversificadas quanto à forma e tamanho, o que gera grandes variações morfológicas e as faz apresentar uma ampla faixa de tamanho (0,5-200 μm).

A conformação morfológica das microalgas é denominada talo, independentemente de serem unicelulares ou pluricelulares, e pode apresentar-se como unicelular, colonial e pluricelular. Os talos unicelulares estão presentes em todas as algas e podem ser aflagelados ou dotados de flagelos como na microalga *Dunaliela salina*, pertencente à divisão Chlorophyta, que é unicelular biflagelada. Nas divisões Cyanophyta e Dinophyta, também podem ser encontrados indivíduos flagelados. As formas unicelulares aflageladas podem se apresentar de forma isolada ou formando colônias, tais como a Cyanophyta *Aphanothece microscopica Nageli* e a Rhodophyta do gênero *Porphyridium* (Guiry e Guiry, 2015).

As formas coloniais são formadas por um agregado de células unidas fisicamente por mucilagem. Há dois tipos: amorfas onde não é verificada

organização das células nas colônias (Cyanophyta, Chlorophyta, Rhodophyta) e cenóbio. Cenóbio é um talo em que as células encontram-se agregadas de maneira organizada com forma e número de células definidos, podendo ser encontrado em microalgas da divisão Chlorophyta como a do gênero *Scenedesmus*. Como exemplo pode-se citar a espécie *Scenedesmus quadriculata*, que forma colônias, podendo conter 2, 4, 8, 16 e, raramente, 32 células dispostas linearmente dentro do cenóbio, com tamanho variando de 8,2 a 9,6 μm de comprimento e de 2,4 a 8,2 μm de largura (Bicudo e Menezes, 2006). Os talos pluricelulares são característicos dos indivíduos formados por duas ou mais células, incluindo as formas filamentosas, podendo formar talos filamentosos ramificados e não ramificados. Os não ramificados formam-se por sucessivas divisões celulares, sempre em um mesmo plano, podendo ocorrer em Cyanophytas, Chlorophytas e Dinophytas. Os talos ramificados caracterizam-se pela mudança no plano das divisões celulares, podendo ser constituídos por uma única série de células (unisseriados), ou por duas ou mais séries (plurisseriados).

As formas filamentosas podem ser encontradas em indivíduos pertencentes às divisões Chlorophyta e Cyanophyta como, por exemplo, a microalga multicelular filamentosa *Spirulina*, que consiste em filamentos verde-azulados com 1-12 μm de diâmetro de células cilíndricas, conforme descrito por Richmond (1988).

A Figura 5.1 mostra uma microalga unicelular representante da divisão Cyanophyta, a *Aphanothece microscopica Nageli*, pertencente à ordem Chroococcales. As microalgas que constituem esta ordem morfologicamente são as mais simples, unicelulares, esféricas, ovoides ou cilíndricas, e se reproduzem por fissão binária (Fay, 1983). A *Aphanothece microscopica Nageli* forma colônias macroscópicas amorfas, com mucilagem abundante, caracterizada por apresentar células de formato elíptico a cilíndrico medindo 9,0-9,5 μm × 4,0-4,2 μm, cerca de 2,1 vezes mais compridas que largas (Coutinho, 1982).

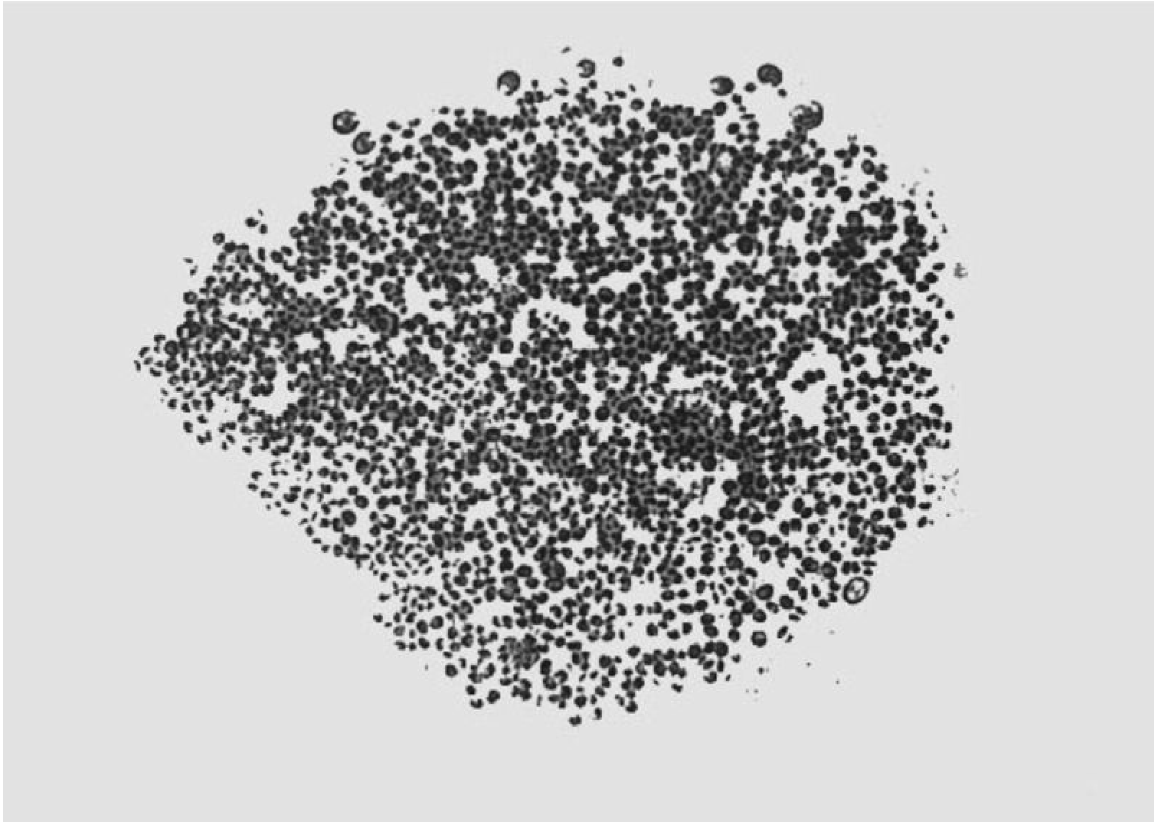


FIGURA 5.1 Cultura de *Aphanothece microscopica Nageli*.

Fonte: Imagem cedida pela Professora Maria Isabel Queiroz.

A divisão Cyanophyta caracteriza-se por conter indivíduos de pequeno diâmetro celular, desde tamanhos típicos de células bacterianas (0,5-1,0 μm) a exemplares que podem apresentar um diâmetro de até 30 μm ou um pouco maior, o que evidencia que as microalgas eucarióticas podem atingir tamanhos muito superiores aos apresentados pelas microalgas procarióticas.

O porquê de as Cyanophytas não atingirem o tamanho das demais divisões de algas eucarióticas pode ser justificado por uma regra biológica, que enfatiza que a taxa metabólica é inversamente relacionada com o tamanho do organismo. Considerando que a taxa metabólica determina a taxa de crescimento, essa relação implica que quanto maior é um organismo mais lentamente ele cresce.

A literatura é ampla quanto a registros de maior taxa de crescimento para microalgas procarióticas em relação às eucarióticas. A exemplo disto, Queiroz *et al.* (2004) reportam maiores taxas de crescimento para a Cyanophyta *Aphanothece microscopica Nageli*, quando comparada a valores obtidos por outros autores para indivíduos da divisão *Chlorophyta,* tais como *Scenedesmus* (Tam e Wong, 2000) e *Chlorella* (Martinez *et al.*, 2000).

Quando pensamos em células procarióticas e eucarióticas, uma das primeiras características que nos vem à mente é a presença de membrana nuclear nas eucarióticas, bem como a informação hereditária codificada no DNA sendo transportada por cromossomos. Nas procarióticas, não se evidencia a membrana nuclear. A região nuclear é preenchida por um sistema fibrilar à base de DNA que não se apresenta organizado em cromossomas individuais.

Não menos característico que a ausência de membrana nuclear e de cromossomas individualizados nos procariotos é a composição química da parede celular. A parede celular é uma estrutura de proteção das células, que se caracteriza por um retículo macromolecular de alta ductibilidade. Este retículo é constituído de polissacarídeos de longas cadeias polimerizadas de açúcares simples, ou aminoácidos, unidade fundamental de todas as paredes das microalgas, exceto para alguns grupos especiais, como as diatomáceas, microalgas integrantes da divisão Heterokontophyta, cuja parede celular é constituída de minerais, ou os representantes da divisão Euglenophyta, que não possuem parede celular. As paredes celulares de plantas, algas e microalgas eucarióticas são constituídas por um polímero de glicose, o que difere fundamentalmente das paredes de procariotos. A composição química da parede celular de bactérias e algas procarióticas é constituída por um mucopolipeptídeo, o peptidoglicano, que é um polímero complexo constituído a partir de dois açúcares aminados e de três a quatro aminoácidos. Os açúcares aminados são o N-acetil-glucosamina e o ácido acetilmurâmico. Os aminoácidos específicos que constituem o peptidoglicano são o ácido glutâmico, alanina, glicina e/ou ácido diaminopimélico. Este último aminoácido só é encontrado na parede celular de procariotos. Os aminoácidos estão ligados ao resíduo do ácido N-acetilmurâmico. O ácido acetilmurâmico tem um grupo carboxila livre, e na molécula do peptidoglicano os aminoácidos estão ligados ao grupo residual carboxila, individualmente ou em curtas cadeias peptídicas por ligações peptídicas. O peptidoglicano, embora sendo a unidade fundamental da composição química da parede celular dos procariotos, não é o único constituinte. As paredes das bactérias são altamente complexas, apresentando outras macromoléculas que incluem lipídios e proteínas.

As bactérias são divididas em Gram-positivas e negativas, segundo a composição química de suas paredes celulares. Hans Christian Gram denominou Gram-positivas as bactérias cujas paredes celulares não perdem a cor azul arrocheada, quando submetidas a um processo de descoloração depois de serem coloridas pelo violeta de genciana, e Gram-

negativas, as que não retêm em suas paredes celulares o corante. A parede celular das bactérias Gram-positivas é composta basicamente por peptidoglicanos ligados uns aos outros por ligações cruzadas, formando uma rede forte, apresentando maior quantidade de peptidoglicano que nas Gram-negativas. Em muitas bactérias Gram-positivas a camada de mucopolipeptídeo é o único constituinte macromolecular da parede. A presença de maior quantidade de peptidoglicano nas Gram-positivas tem sido apontada como fator determinante na retenção do corante de Gram pela parede celular. A microscopia evidencia que nas bactérias Gram-negativas existem diferentes camadas de macromoléculas formando a parede celular, além de a camada de mucopolipeptídeo sempre conter grande quantidade de proteína e lipopolissacarídeo. A parede celular das microalgas procariontes (Cyanophyta e *Prochlorophyta*) segue o padrão registrado para as bactérias Gram-negativas que se caracterizam por apresentarem em seu sistema fotossintético clorofila *a* e ficobilinas. No entanto, devido à presença de clorofila *b* e ausência de ficobilinas em Prochlorophytas, estas microalgas foram consideradas uma divisão separada. Muitos autores preferem não aceitar a divisão Prochlorophyta e reclassificam os gêneros como cianobactérias com clorofila *b* e ficobiliproteínas. As paredes celulares destas microalgas (Prochlorophyta e Cyanophyta) são compostas por várias camadas. Apenas duas camadas mais internas são as mesmas para todas as microalgas procarióticas. A estrutura química das camadas mais externas depende das condições ambientais.

Os caracteres peculiares de cada grupo tornam estes micro-organismos seres metabolicamente diferenciados. Embora o perfil pigmentar das microalgas faça da fotossíntese o principal modelo metabólico, estes organismos destacam-se pela notável versatilidade de prover energia necessária ao crescimento e manutenção, o que os identifica como potencial fonte de recursos a serem explorados biotecnologicamente.

5.3. Fundamentos do metabolismo microalgal

Independente das características morfológicas e estruturais entre os indivíduos que integram as diferentes divisões, as microalgas apresentam comportamentos fisiológicos similares, tendo como característica metabólica fundamental a fotossíntese, tal como os vegetais superiores.

As reações de captação da luz nas plantas superiores e algas eucarióticas ocorrem nas membranas internas dos cloroplastos, nos tilacoides e ramificações da membrana plasmática, onde são encontrados os pigmentos fotossintéticos (clorofilas, carotenoides e ficobilinas) e as enzimas necessárias para a utilização da luz e fixação de dióxido de carbono. Os pigmentos estão localizados em estruturas altamente organizadas, chamadas fotossistema I (FSI), ou centro de reação (P700) e fotossistema II (FSII), ou centro de reação (P680), os quais estão interligados através de uma série de transportadores de elétrons. Os fotossistemas são complexos enzimáticos capazes de utilizar a luz como elemento redutor, produzindo a força motriz para o transporte de elétrons. Nas microalgas procarióticas estas estruturas encontram-se nos tilacoides. Quando a luz é absorvida, uma série de reações de oxirredução é iniciada (Smith, 1982).

5.3.1. Pigmentos fotossintéticos

As clorofilas são estruturas planas, poliédricas, esterificadas por uma longa cadeia lateral de um álcool (fitol), como exemplificado na Figura 5.2. Ocorrem nos cloroplastos das folhas e outros tecidos das plantas, bem como nas diferentes divisões de microalgas como evidenciado no Quadro 5.1. As clorofilas são moléculas formadas por complexos derivados da porfirina, tendo como átomo central o magnésio. É uma estrutura macrocíclica, insaturada, constituída por 4 anéis pirrólicos. Esses anéis são numerados de 1 a 4, conforme o sistema de enumeração de Fisher. São reconhecidos, quatro tipos de clorofila, *a*, *b*, *c* (*c*1, *c*2) e *d*.

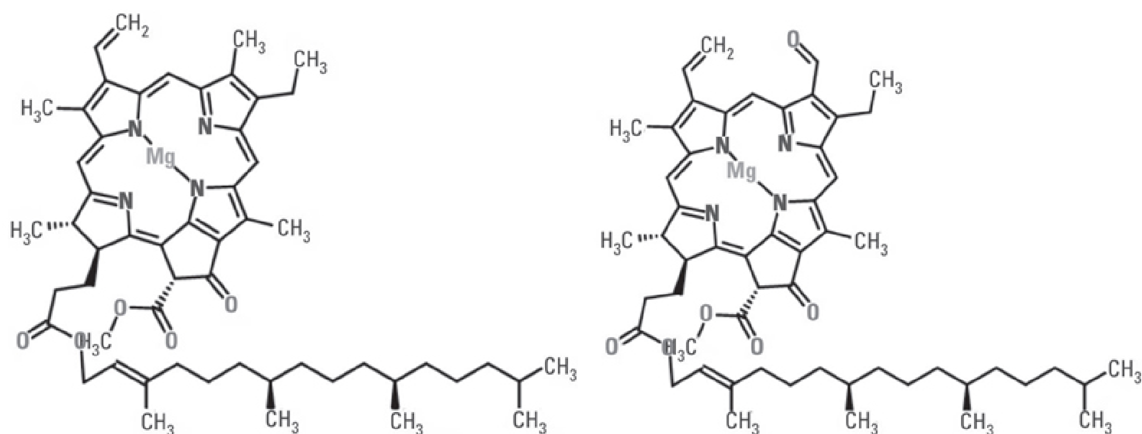


FIGURA 5.2 **Exemplificação da estrutura da molécula de clorofila.** *Fonte*: http://www.chemspider.com/.

Quadro 5.1 Ocorrência de pigmentos segundo as divisões de microalgas

Divisão	Clorofilas	Ficobiliproteínas	Carotenoides
Cyanophyta	×	×	×
Chlorophyta	×		×
Cryptophyta	×	×	×
Chrysophyta	×		×
Dinophyta	×		×
Euglenophyta	×		×
Haptophyta	×		×
Prochlorophyta	×		×
Rhodophyta	×	×	×

Nos cloroplastos das células de vegetais superiores e algas eucarióticas há os tipos de clorofila *a* e *b*. As clorofilas *a* e *b* diferem nos substituintes de carbono C3. Na clorofila *a*, o anel pirrólico contém um grupo metil (-CH3) no C3, e a clorofila *b* contém um grupo aldeído (-CHO), que substitui o grupo metil (Figura 5.2). A clorofila *a*, é o principal elemento fotoquimicamente ativo que atua como receptor de energia luminosa para a efetivação do processo fotossintético, convertendo-a em energia química. Os outros tipos de clorofilas e os demais pigmentos funcionam como acessórios. A energia luminosa por eles absorvida é transmitida de molécula a molécula até atingir uma molécula especializada de clorofila *a*,

a qual é identificada pelo pico de máxima absorção que apresenta (700 nm), que se situa acima do pico de máxima absorção da clorofila *a* (580-670 nm). Esta molécula de clorofila quimicamente ativa é chamada 700 (P700) e está associada a outras moléculas de clorofila e outros pigmentos e constitui o centro de reação fotossintético (FSI). Quando o FSI é iluminado, ocorre uma pequena redução na absorção a 700 nm, resultante da fotoxidação do centro de reação deste sistema. Processo similar ocorre com o FSII (P680). Assim, os pigmentos absorvem luz de vários comprimentos de onda, transferindo a energia para a clorofila *a*, ocorrendo a liberação de elétrons para a cadeia transportadora.

As ficobiliproteínas são os pigmentos acessórios responsáveis pela maior parte da luz requerida para a fotossíntese. São macromoléculas constituídas de proteína com grupos cromóforos tetrapirrólicos denominados bilinas ou ficobilinas, covalentemente unidos por ligações tisteres a resíduos de cisteína das proteínas (Figura 5.3). Estes pigmentos são exclusivos das divisões Cyanophyta, Cryptophyta e Rhodophyta. Agrupam-se formando estruturas que levam o nome de ficobilissomos, localizando-se na superfície dos tilacoides. Nas divisões Cyanophyta, Rhodophyta e Cryptophyta estas estruturas encontram-se no interior dos tilacoides. De uma forma geral, estes pigmentos mascaram a presença de clorofila, proporcionando aos indivíduos coloração azulada ou avermelhada.

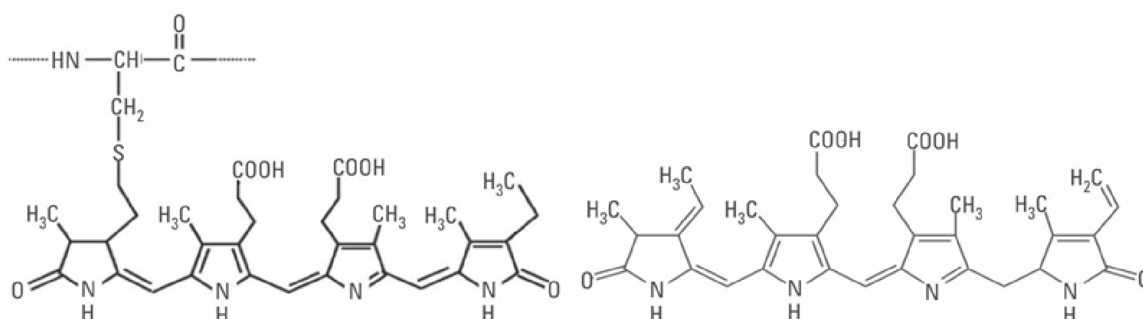


FIGURA 5.3 Ficobilinas presentes em microalgas. *Fonte*: http://www.chemspider.com/.

Esta classe de pigmentos é composta por quatro tipos, os quais estão expressos no Quadro 5.2, bem como as regiões do espectro solar, nas quais são absorvidas, e os comprimentos de onda de máxima absorção.

Quadro 5.2 Classificação das ficobiliproteínas e suas respectivas faixas de absorção

Ficobiliproteína	Faixa de absorção	Comprimento de onda (nm)
Ficoeritrina	vermelho	565
Ficoeritrocianina	vermelho	568
Ficocianina	azul	620-638
Aloficocianina	azul	650

Apresentando estes compostos uma ampla faixa de absorção de energia, eles permitem aos organismos aos quais estão associados, estender os limites de seus espectros de absorção ao coletar luz que não é absorvida com eficiência pela clorofila *a*.

Estes pigmentos acessórios participam de uma corrente de energia que transfere energia de excitação por processos de menor radiação para os centros de reação das membranas tilacoides (FSI e FSII), para conversão em energia química. A transferência de energia segue uma sequência iniciada pela ficoeritrina (menor valor de comprimento de onda de absorção), seguida por ficoeritrocianina, ficocianina, aloficocianina (maior valor de comprimento de onda de absorção) e finalmente, para a clorofila *a*.

Voltando ao Quadro 5.1, fica claro que nem todas as microalgas contêm ficobiliproteínas, mas que todas contêm clorofila *a* e carotenoides. A energia luminosa só pode ser utilizada pelos pigmentos fotossintéticos na faixa do espectro da luz entre 400 e 700 nm (Falkowski e Raven, 2007). As clorofilas absorvem na faixa (650-700 nm) e os carotenoides em 400-500 nm. Isso demonstra que os carotenoides são fundamentais para o processo fotossintético. Assim, estes pigmentos acessórios, tais como as ficobiliproteínas, apresentam seus espectros de absorção complementares aos da clorofila *a*, ampliando a faixa de absorção. No entanto, destacam-se não apenas pela contribuição em ampliar o espectro de absorção da energia luminosa, mas principalmente por exercerem uma proteção contra a fotoxidação do sistema fotossintético por ação da luz e do oxigênio.

Os carotenoides atuam retirando o excesso de energia de moléculas de clorofilas energizadas, o qual pode ser transferido para o oxigênio, produzindo uma forma excitada e reativa do átomo de oxigênio, causando a morte celular. Assim, sem os carotenoides em uma atmosfera com oxigênio, não seria possível a ocorrência da fotossíntese, a luz absorvida

pelas clorofilas na presença do ar causaria fotoxidação com destruição da célula. Os carotenoides estruturalmente são compostos de longas cadeias lineares, de coloração laranja, amarela ou vermelha, constituídos de um terpeno de 40 carbonos e dividem-se em dois grupos, os carotenos e as xantofilas. Dentre os carotenos o mais amplamente distribuído é o β-caroteno, seguido do α-caroteno. No que se refere às xantofilas, uma gama destes pigmentos está presente nas membranas fotossintetizantes das microalgas, com destaque especial à luteína, amplamente encontrada em microalgas (Figura 5.4).

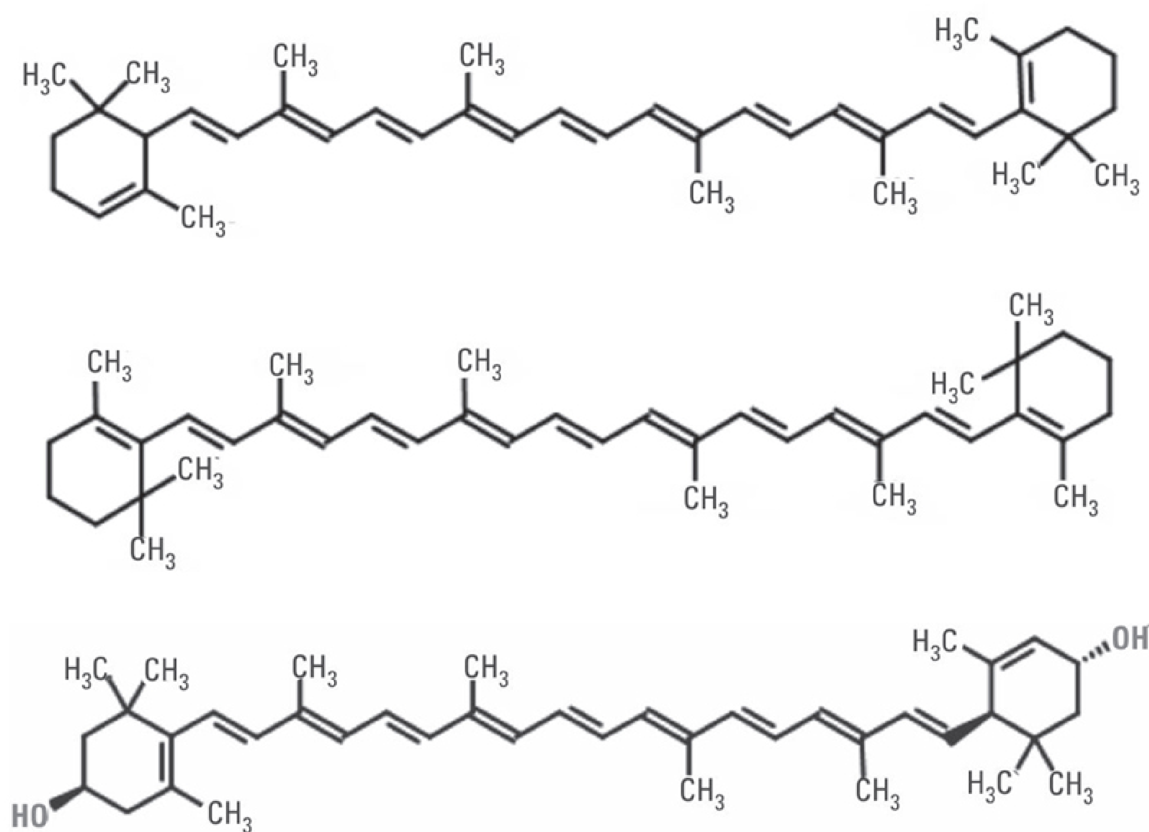


FIGURA 5.4 Carotenoides típicos de microalgas. *Fonte*: http://www.chemspider.com/.

5.3.2. Fotossíntese

A fotossíntese pode ser definida como a síntese de compostos orgânicos através da fixação de dióxido de carbono a partir da absorção da energia luminosa pelo sistema pigmentar dos organismos fotossintéticos.

Os primeiros seres a utilizarem o metabolismo fotossintético foram procariotos, bactérias purpurinas e verdes, cujo sistema pigmentar era muito simples requerendo apenas a capacidade de captar luz, passando a ter um elétron de alta energia que podia ser transferido a alguma molécula como o NAD (nicotinamida dinucleotídeo). Para que o processo pudesse prosseguir se fazia necessária na natureza a presença de um redutor capaz de repor este elétron, como gás sulfídrico, tal como ocorria no ambiente em que as primeiras células viviam, um meio de composição variada, rico em gás carbônico e ausente de oxigênio. Estes procariotos eram capazes de converter a energia solar em ATP (adenosina trinucleotídeo) e gerar poder redutor NADPH (adenosina difosfato). O ATP e o NADPH gerados eram então utilizados para converter o carbono a partir do gás carbônico para compostos reduzidos na forma de compostos de carbono (CH_2O), sem produção de oxigênio, segundo a reação abaixo descrita (Equação 1).



$$CO_2 + 2H_2S \rightarrow CH_2O + 2S + H_2O \quad \textbf{(1)}$$

A sobrevivência destes organismos ficou restrita aos locais onde houvesse disponibilidade de redutores como o gás sulfídrico. As Cyanophytas foram os primeiros procariotos que desenvolveram um aparelho fotossintético capaz de utilizar a água como redutor e, portanto, realizar fotossíntese com liberação de oxigênio (Equação 2), tal como as plantas superiores e algas eucarióticas. Esta equação descreve a reação de oxirredução, onde a água doa elétrons (hidrogênio), para redução do gás carbônico (CO_2), até carboidratos (CH_2O), com liberação de oxigênio molecular.



$$CO_2 + H_2O \rightarrow CH_2O + O_2 \quad \textbf{(2)}$$

A fotossíntese oxigênica, é classicamente dividida em duas fases. A fase clara em que a energia luminosa é utilizada para síntese de ATP e NADPH e a fase escura em que estes compostos são utilizados para a fixação de gás carbônico. A fixação de gás carbônico não é diretamente dependente da luz e, por isso, o processo é chamado de reação no escuro. A energia absorvida pelo FSI é transferida para o centro de reação do fotossistema, P700, que excitado, perde elétrons transformando-se em um redutor. Estes elétrons são transportados por uma série ordenada de compostos até o

NADP, último aceptor que é reduzido a NADPH. Processo similar ocorre no FSII, que perde elétrons através de P680. Os elétrons emitidos pelo P680 são recebidos por uma cadeia de receptores de elétrons, cujo aceptor final é P700. Deste modo, os elétrons de P700 são repostos à custa do P680, que ao perder elétrons, se transforma em forte oxidante. Em suma, o resultado da ação da luz no FSII é a oxidação de P680 e a redução de P700. A redução de P700 ocorre através de elétrons provenientes da fotólise da água responsável pela liberação de oxigênio na fotossíntese oxigênica, característica das plantas superiores, algas e microalgas eucarióticas e procarióticas. Assim, a função do FSI é gerar um redutor capaz de formar NADPH, a do FSII, gerar um oxidante capaz de clivar a água.

Da ação acoplada dos dois fotossistemas, obtém-se a equação geral de oxirredução da fotossíntese (Equação 3).



$$2H_2O + 2NADP \rightarrow 2NADPH + 2H^+ + O_2 \quad (3)$$

A ligação entre FSI e FSII é realizada por uma sequência de transportadores de elétrons, com potenciais de oxirredução crescentes, conduzindo assim a interação dos fotossistemas à transferência de elétrons provenientes da fotólise da água a NADPH e concomitantemente a geração de um gradiente de fótons (prótons), para a síntese de ATP. A força próton–motriz deste gradiente suporta a síntese de ATP.

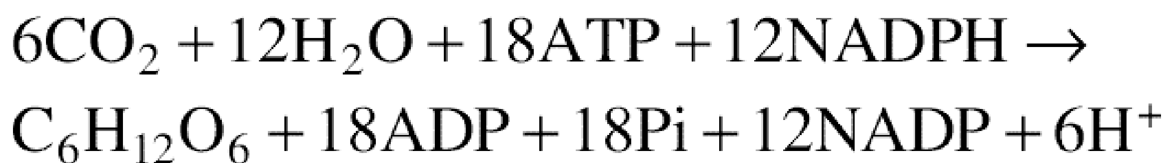
Na segunda fase do processo fotossintético, comumente denominada fase escura, ocorre a redução do gás carbônico a partir do ATP e do NADPH gerado na fase clara, mediante um conjunto de reações que integram o ciclo de Calvin. Embora denominada fase escura, é importante salientar que o ciclo de Calvin só ocorre em presença de luz, em consequência da regulação da ribulose 1,5-difosfato carboxilase, enzima que catalisa o processo de incorporação do gás carbônico em uma molécula orgânica.

A fixação do dióxido de carbono acontece mediante sua reação com ribulose 1,5-difosfato, formada por fosforilação da ribulose-5-fosfato às expensas de ATP, produzindo duas moléculas de 3-fosfoglicerato. Esta reação é catalisada pela ribulose 1,5-difosfato carboxilase, enzima ausente em tecidos animais.

O 3-fosfoglicerato é então fosforilado por ATP, resultando 1,3-difosfoglicerato, que é reduzido a gliceraldeído 3-fosfato, cuja reação é catalisada pela enzima gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase específica para NADPH. O produto de reação (3-fosfoglicerato) é então quebrado em

duas moléculas de três carbonos, cuja redução provocada pelo transportador de elétrons, NADPH, conduz a uma série de açúcares fosforados intermediários e finalmente à glicose. Esta sequência de transformações metabólicas é conhecida como ciclo de Calvin (Calvin e Benson, 1948). Assim, a partir da ribulose 1,5-difosfato são produzidas duas moléculas de gliceraldeído 3-fosfato, uma das quais contém o átomo de carbono incorporado pela fotossíntese. Através de uma sequência de interconversões a ribulose 1,5-difosfato pode ser regenerada.

Desta forma, iniciando o ciclo de Calvin com seis moléculas de ribulose 1,5-difosfato, é possível a produção de uma molécula de glicose-6-fosfato e a regeneração das seis moléculas iniciais de ribulose 1,5-difosfato. Neste ciclo, há o consumo de 18 ATP e 12 NADPH, que corresponde ao dispêndio de energia para a síntese de uma molécula de glicose, o que corresponde à equação geral do ciclo de Calvin (Equação 4):



$$6CO_2 + 12H_2O + 18ATP + 12NADPH \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 18ADP + 18Pi + 12NADP + 6H^+ \quad \textbf{(4)}$$

Os organismos que fixam gás carbônico através da reação catalisada pela ribulose 1,5-difosfato carboxilase, de uma forma geral, as plantas superiores e as algas, são chamados de C3, porque o produto de incorporação, o 3-fosforoglicerato, é um composto de três carbonos.

As plantas tropicais apresentam uma modificação na forma de fixação, incorporando a molécula de gás carbônico no oxalacetato, um composto de quatro carbonos e por isso são chamadas de C4. A incorporação no oxalacetato constitui uma etapa precedente ao processo de incorporação que ocorre nos organismos C3, constituindo uma forma de armazenamento de gás carbônico a ser disponibilizado para o ciclo de Calvin. As microalgas possuem fundamentalmente a via fotossintética C3, no entanto em algumas espécies evidencia-se a rota intermediária C4, em especial em indivíduos da divisão Cyanophyta (Fay, 1983). Nesta rota, a incorporação do gás carbônico é efetuada mediante a carboxilação do fosfoenolpiruvato, catalisada pela enzima fosfoenolpiruvato carboxilase com geração de oxalacetato e fosfato (Equação 5):



$$C_3H_5O_6P + CO_2 \rightarrow C_4H_5O_5 + PO_4^{-3} \quad (5)$$

O oxalacetato é prontamente convertido a C4 ácidos dicarboxílicos, tais como cítrico ou málico, e subsequentemente a aminoácidos, como aspártico e glutâmico. Esta rota remanescente do C4 ácido dicarboxílico complementa a rota redutora das pentoses fosfato. A presença de dois sistemas de carboxilação operando em paralelo pode representar uma importante adaptação das microalgas a bruscas mudanças ambientais. Por exemplo, em condições de luz limitadas, a assimilação do carbono é catalisada preferencialmente no sentido da síntese de aminoácidos e outros constituintes celulares essenciais. Em condições de saturação luminosa, açúcares e amido são formados via rota redutora das pentoses fosfato. Isso indica que em alta luminosidade a taxa de fixação de gás carbônico pode exceder a taxa de assimilação de nitrogênio e, desta forma, o excesso de carbono e de energia fotossintética é estocado na forma de glicogênio.

Por conta de ser o metabolismo fotossintético preferencial das microalgas, a assimilação das diferentes formas de carbono inorgânico é favorecida em detrimento das formas orgânicas. Estes organismos são capazes de utilizar como fonte de carbono inorgânico o gás carbônico livre e os íons bicarbonato, os quais são transportados através da membrana plasmática, sendo então acumulados nas células como reservatório. O bicarbonato é convertido em gás carbônico através da enzima anidrase carbônica, que tem sua atividade aumentada quando a concentração externa de gás carbônico diminui (Equação 6):



$$HCO_3^- + H^+ \rightarrow CO_2 + H_2O \quad (6)$$

A forma e a quantidade de carbono inorgânico a ser utilizado, depende de variáveis ambientais, como pH, salinidade, pressão e temperatura. As microalgas têm desenvolvido vários mecanismos, pelos quais, em cada ambiente específico, possam utilizar o carbono inorgânico. Consequentemente a utilização da forma preferida de carbono depende da espécie. Muitas espécies podem utilizar tanto gás carbônico como bicarbonato, e algumas espécies capazes de viver em ambiente extremamente alcalino podem utilizar carbonato. Em termos quantitativos, considerando que a maioria das microalgas são organismos aquáticos, a maior concentração disponível está sob a forma de bicarbonato, uma vez

que quando o gás carbônico é dissolvido em água reage com as moléculas de água e forma um sistema tampão. Este equilíbrio depende do pH, o que significa que a quantidade relativa da espécie de carbono inorgânico dissolvida está estritamente relacionada com o pH do meio. Com base no equilíbrio das espécies de carbono, no intervalo em que a maioria das microalgas cresce (6,5 a 10), a forma dominante de carbono inorgânico é o bicarbonato. Mas independente da disponibilidade no meio ambiente, das diferentes formas de carbono inorgânico, as microalgas quando submetidas à ausência de luz passam a se valer do metabolismo heterotrófico, para a manutenção de suas estruturas a partir de diferentes formas de carbono orgânico.

5.3.3. Respiração

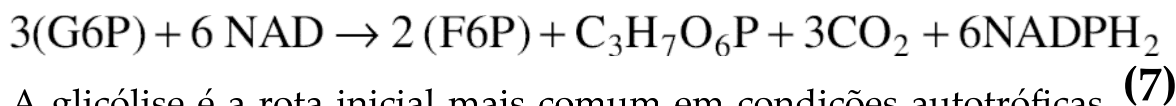
O crescimento heterotrófico se caracteriza pela utilização de carbono orgânico exógeno, tendo como principal fonte carboidratos e ácidos orgânicos. Pode ser definido como um conjunto de reações de oxirredução, através das quais uma molécula orgânica é degradada a moléculas mais simples. Quando o aceptor final de hidrogênio produzido pela oxidação resultar em uma substância orgânica, este processo é definido como fermentação. Quando são formadas substâncias de menor conteúdo energético, como gás carbônico e água, denomina-se respiração. Desta forma, na respiração, os nutrientes orgânicos são oxidados, principalmente a gás carbônico, enquanto o oxigênio molecular é reduzido à água.

A fermentação corresponde a uma oxidação incompleta, se caracterizando por uma menor liberação de elétrons, onde uma substância orgânica originária da degradação do substrato serve de aceptor de elétrons e de prótons, podendo se considerar que a mesma substância serve ao mesmo tempo de aceptor de elétrons e de prótons.

O processo respiratório resulta de uma degradação completa do substrato com grande liberação de elétrons e prótons, onde o aceptor final é o oxigênio molecular. Mesmo os organismos autotróficos são capazes de produzir energia a partir da oxidação de compostos orgânicos, se valendo das rotas metabólicas heterotróficas, no entanto, diferindo quanto à origem do substrato. Nos autotróficos, a fonte de carbono orgânico tem origem no processo interno da fotossíntese, nos quimiotróficos (heterotróficos), o carbono é captado do meio externo. Esta propriedade apresentada pelas microalgas heterotróficas supera grandes limitações no que se refere a suas aplicações biotecnológicas na geração de produtos de interesse, principalmente no tocante a dependência da luz e a utilização de fonte de

carbono, fatores que aumentam o custo e reduzem o rendimento de produção (Queiroz *et al.*, 2011).

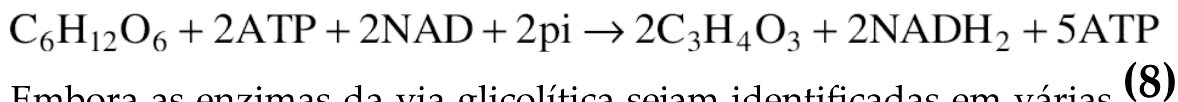
O metabolismo inicial da glicose pode ocorrer por duas vias metabólicas: pela glicólise ou via de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) e via das pentoses. A rota inicial mais utilizada por microalgas heterotróficas é a via das pentoses, originada pela via hexose monofosfato. Entre os produtos finais da via das pentoses destacam-se a frutose 6-fosfato (F6P) e o gliceraldeído 3-fosfato, que são compostos intermediários da glicólise, produzidos a partir da glicose 6-fosfato (G6P). Desta forma, a via das pentoses, comporta-se como uma preparação para gerar ATP para via glicolítica, a partir do ciclo do ácido cítrico (TCA). Esta é estritamente aeróbica e fornece pentoses requisitadas para síntese de ácidos nucleicos e dos grupos prostéticos que contêm nucleotídeos, bem como os elementos necessários para a síntese de aminoácidos aromáticos e vitaminas. Esta rota não fornece energia diretamente, mas o NADPH2 pode constituir uma fonte de ATP se os elétrons forem reportados até o oxigênio, através da cadeia respiratória. O NADPH2 também pode ser utilizado pelo metabolismo lipídico. A Equação 7 expressa o processo global da via das pentoses:



$$3(G6P) + 6\,NAD \rightarrow 2\,(F6P) + C_3H_7O_6P + 3CO_2 + 6NADPH_2 \quad \textbf{(7)}$$

A glicólise é a rota inicial mais comum em condições autotróficas, onde há o consumo da glicose originada da fotossíntese. O produto final é o piruvato, o qual pode ser utilizado no ciclo do ácido cítrico, tendo início com a ativação da (G6P), por meio do ATP, isomerização e uma segunda fosforilação, para que seja obtida a frutose 1,6-difosfato e 2 ADP. A frutose 1,6-difosfato é clivada em duas moléculas de triose-fosfato (dihidroxiacetona fosfato e 3-fosfogliceraldeído), pela enzima aldolase, característica desta via metabólica. O 3-fosfogliceraldeído é então oxidado, seguido pela redução de NAD a NADH, catalisado pela triose fosfato desidrogenase. Esta reação é acompanhada por uma fosforilação no nível do substrato, que conduz à formação de 1,3-difosfatoglicérico, composto com ligação rica em energia, que, mediante catálise da enzima fosfogliceroquinase, origina 3-fosfoglicerato, que é isomerizado e desidratado para formar fosfoenolpiruvato. Assim, o piruvato, produto final da glicólise, é obtido mediante transferência de ligações ricas em energia do fosfoenolpirúvico ao ADP, com formação de piruvato e ATP. Para cada mol de glicose consumida, 2 ATP são finalmente formados e 2

NAD são reduzidos. O balanço total do processo pode ser expresso pela Equação 8:



$$C_6H_{12}O_6 + 2ATP + 2NAD + 2pi \rightarrow 2C_3H_4O_3 + 2NADH_2 + 5ATP \quad \textbf{(8)}$$

Embora as enzimas da via glicolítica sejam identificadas em várias microalgas eucarióticas, e em especial na divisão Cyanophyta, suas atividades são extremamente baixas, e nestas, certamente, um metabolismo fermentativo pode suportar um crescimento no escuro. Desta maneira, o rendimento energético no escuro destas microalgas é dependente de oxigênio e principalmente da rota das pentoses, onde a G6P é oxidada e descarbolizada em duas etapas, a ribulose 5-fosfato, mediante catálise das enzimas G6P desidrogenase e gliconato desidrogenase, respectivamente. Ambas as enzimas estão presentes em altas concentrações nas Cyanophytas e ambas são NADP-específicas, assim, duas moléculas de NADPH são geradas. A subsequente oxidação do NADPH, durante o transporte de elétrons pela cadeia respiratória, rende duas moléculas de ATP. A rota das pentoses é ativada no escuro e inibida na presença de luz. No entanto, o exato mecanismo como isso acontece não é completamente conhecido.

As Cyanophytas diferem de outros procariotos, por apresentarem baixa taxa de respiração endógena, em geral, e por terem uma limitada habilidade de utilizar substâncias orgânicas como fonte de carbono no escuro. As reações para que isso ocorra não são completamente claras e, aparentemente, são muito complexas. Sabe-se que as Cyanophytas, ao contrário de bactérias heterotróficas e microalgas eucarióticas, não possuem o ciclo do ácido cítrico completo. Algumas enzimas essenciais deste ciclo, como α-oxoglutarato desidrogenase, succinil-Coa sintetase e succinato desidrogenase estão presentes em baixíssimas concentrações, ou mesmo ausentes nestas células. Esta situação é similar em outros grupos procariotos autótrofos. Esta deficiência enzimática impede o fluxo intermediário do ciclo do ácido cítrico e, consequentemente, a utilização de substratos tais como, acetatos, piruvatos ou ácidos carboxílicos, para eficiente produção de energia e crescimento no escuro. Contudo, embora apresentem o ciclo do ácido cítrico incompleto, estas microalgas são capazes de sintetizar aminoácidos. Além disto, enzimas da rota glioxilato estão presentes nas Cyanophytas em concentrações relativamente baixas. Estas rotas permitem um limitado fluxo de carbono de isocitrato para succinato e, por conseguinte, no que se refere à síntese de clorofila,

citocromos e ficobiliproteínas. Os principais componentes da cadeia transportadora de elétrons na respiração parecem estar presentes nas Cyanophytas.

Da interação existente entre os processos fotossintéticos e respiratórios, resulta que a taxa de respiração endógena nas algas eucarióticas e nas plantas superiores é, em geral, similar na luz ou no escuro. Nas Cyanophytas, no entanto, a captação de oxigênio é afetada pela luz. Em baixa intensidade luminosa há uma inibição do consumo de oxigênio no processo respiratório, em altas intensidades a captação de oxigênio é marcadamente aumentada.

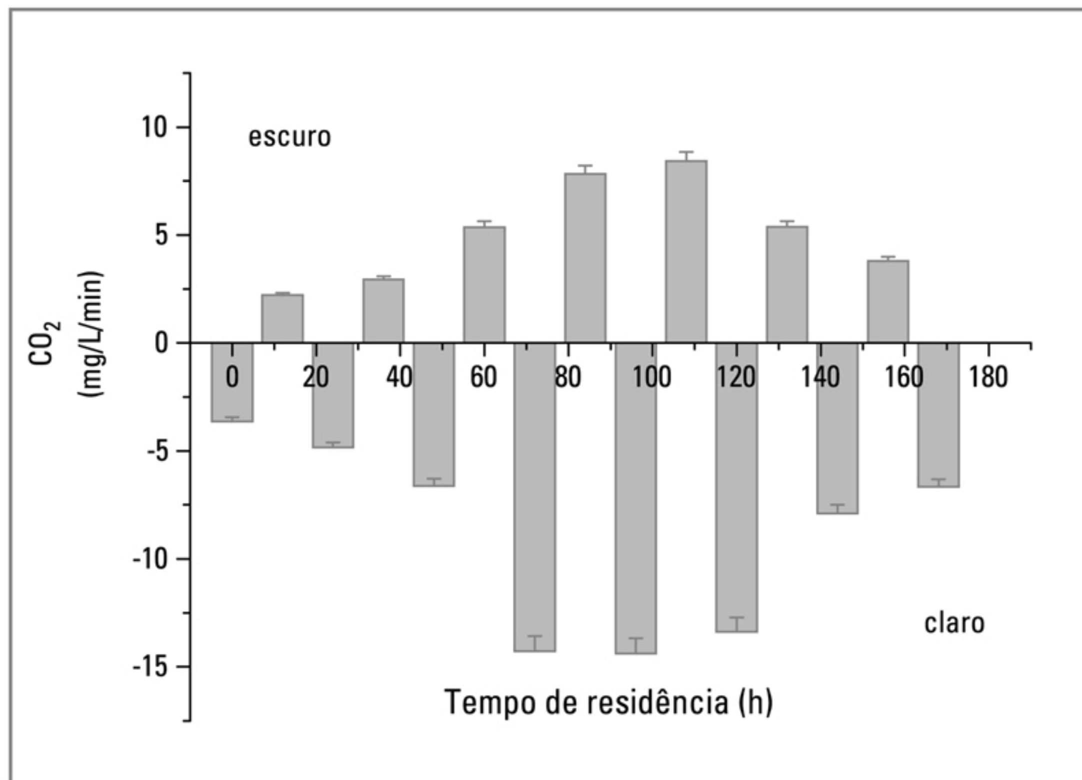
A habilidade de algumas espécies de microalgas em crescer no escuro, às expensas de carbono orgânico, demonstra sua versatilidade nutricional e amplia seu potencial de aplicação tecnológica como biocatalisadores.

5.3.3.1. Utilização de substratos orgânicos por microalgas

A utilização de determinado composto orgânico pelas microalgas, em especial as pertencentes à divisão Cyanophyta, é dependente da espécie, o que significa que, enquanto algumas espécies são capazes de assimilar uma molécula específica, outras não. Poucos são os compostos orgânicos reconhecidamente capazes de suportar o crescimento no escuro. Dentre as moléculas orgânicas utilizadas, as mais estudadas têm sido monossacarídeos como glicose, frutose, galactose e dissacarídeos como a sacarose, manose e lactose (Francisco *et al.*, 2014). Outros compostos tais como ácido acético e glicerol também têm sido estudados. Alguns ácidos orgânicos como o acético e aminoácidos são assimilados por espécies autotróficas em presença de luz, mas seu metabolismo é limitado para síntese de lipídios e aminoácidos.

O requerimento básico para um dado composto orgânico ser utilizado por uma microalga está associado a sua capacidade de ser transportado através da membrana até o interior da célula. A permeabilidade da membrana celular varia com a substância orgânica e pode depender da presença de um transportador específico (permeases), que intermedia a captação de substâncias em particular. Na ausência de mecanismos de transporte específicos, o material orgânico pode entrar na célula por difusão passiva ao longo de um gradiente de concentração. No entanto, a taxa de difusão geralmente é inadequada para suportar o crescimento no escuro em muitas espécies.

Algumas cepas são capazes de assimilar substratos orgânicos, logo após serem submetidas à ausência de luz, outras requerem um período de adaptação, o que pode estar associado à síntese de enzimas, que envolvem o metabolismo heterotrófico no escuro. Além disto, o crescimento heterotrófico se caracteriza por algumas vantagens em relação ao crescimento autotrófico, de suma importância sob o ponto de vista de exploração biotecnológica destes micro-organismos. Vantagens como a taxa de crescimento mais elevada, maior produção de biomassa e a eliminação da infraestrutura de iluminação. Por outro lado, apresenta desvantagens, principalmente no que se refere ao elevado custo de substratos orgânicos a serem utilizados. A título de ilustração, a Figura 5.5 demonstra as dinâmicas de consumo e liberação de CO_2 e O_2 em cultivos da cianobactéria *Aphanothece microscopica Nägeli* em ciclos de claro/escuro. Os dados demostram a imediata capacidade desta espécie em modular ambos os metabolismos paralelamente.



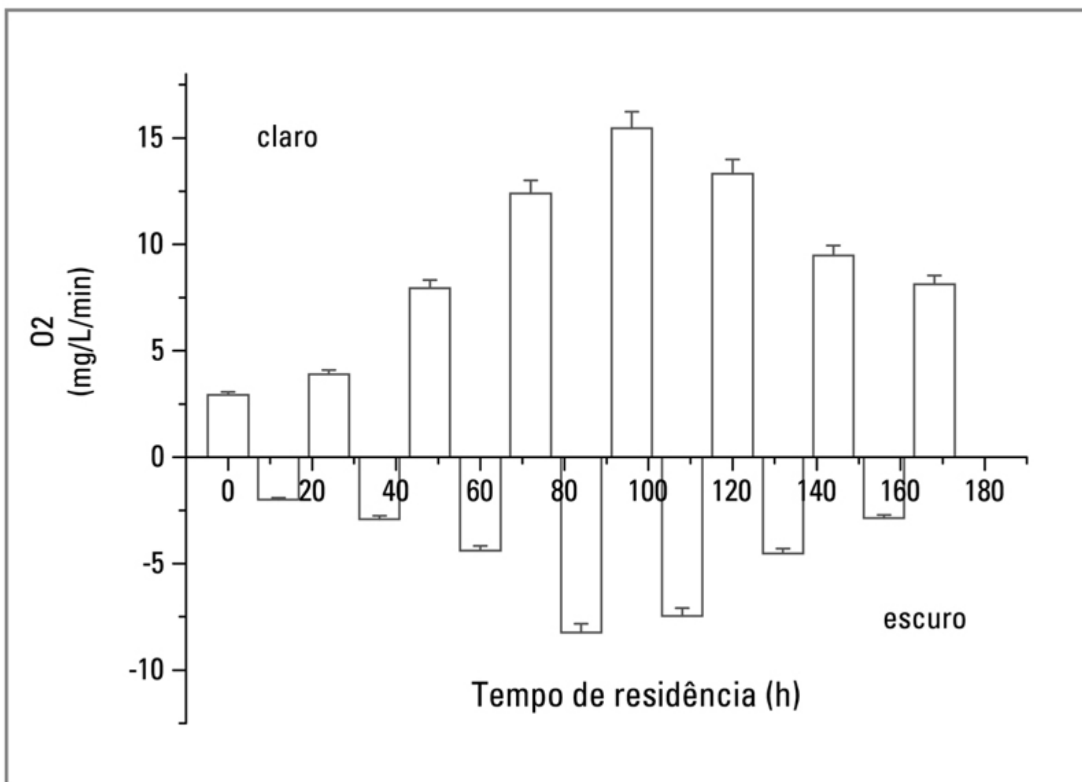
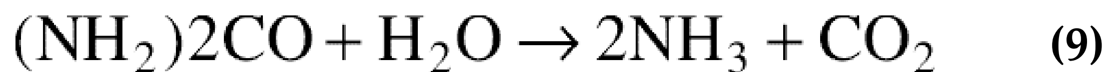


FIGURA 5.5 Efeito do fotoperíodo no consumo e produção de dióxido de carbono e oxigênio em cultivos da *Aphanothece microscopica* Nägeli. *Fonte*: Adaptado de Jacob-Lopes *et al.* (2010).

Ainda que as microalgas se caracterizem por apresentarem como modelo nutricional primário a fotossíntese e algumas delas sejam capazes de crescer heterotroficamente, com base em suas respostas aos substratos orgânicos estes micro-organismos podem ser denominados mixotróficos que expressam uma variante do regime de crescimento heterotrófico, onde gás carbônico e substrato orgânico podem ser assimilados se mantendo em operação, tanto a fotossíntese como a respiração. O oxigênio produzido na fotossíntese é então consumido na rota heterotrófica, ao mesmo tempo em que o gás carbônico gerado pela oxidação dos compostos orgânicos é aproveitado na fotossíntese. Em um sistema ideal em que as taxas fotossintéticas e respiratórias são correspondentes, não ocorreria a liberação de oxigênio e de gás carbônico para o meio externo, pois haveria um equilíbrio entre consumo e produção destes compostos. Na prática isso não é verificado, ocorrendo a liberação de gases, dependendo da rota metabólica predominante.

5.4. Metabolismo do nitrogênio

As microalgas são capazes de metabolizar diferentes formas de compostos nitrogenados para suportar o crescimento e manutenção celular. Fontes orgânicas nitrogenadas, como ureia e aminoácidos, têm acesso ao interior da célula, mediante transporte ativo. Alguns aminoácidos têm sido utilizados como fonte de carbono e nitrogênio, visando suportar o crescimento microalgal no escuro, porém, a forma mais difundida como fonte de nitrogênio é a ureia, a qual é hidrolizada a NH_3 e CO_2, podendo os dois compostos gerados ser utilizados para o crescimento celular.



$$(NH_2)2CO + H_2O \rightarrow 2NH_3 + CO_2 \qquad \textbf{(9)}$$

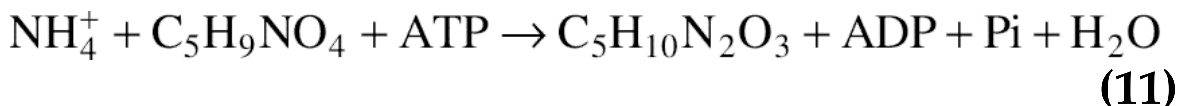
No entanto, a amônia é a forma metabolicamente preferida, uma vez que sua absorção e assimilação consistem em menor gasto energético quando comparado a outras fontes nitrogenadas. É altamente solúvel e quando dissolvida em água reage para formar um sistema tampão amônia/amônio.



$$NH_3 + H_2O \rightarrow NH_4^+ + OH^- \qquad \textbf{(10)}$$

O equilíbrio entre as formas de amônia ionizada (NH_4^+) e livre (NH_3), presentes no meio é dependente de fatores ambientais, como pH e temperatura. A valores de pH maiores que 9,5 (pK a 25°C), a forma dominante é NH_3. Por outro lado, a temperatura também tem efeito significativo sobre o equilíbrio iônico. O valor de pK diminui à medida que a temperatura aumenta, o que significa que a forma de amônia livre passa a ser dominante a baixos valores de pH, quando as temperaturas são elevadas. A assimilação de amônio-amônia se efetua mediante um complexo enzimático, constituído pelas enzimas glutamina sintetase, glutamato sintetase e glutamina oxoglutamato aminotransferase (GOGAT). Em uma primeira fase, o glutamato reage com amônio, impulsionado energeticamente com ATP, para formar o aminoácido glutamina, sob catálise da enzima glutamato sintetase (Equação 11). Em uma segunda fase, a glutamina formada reage com α-oxoglutarato,

resultando em duas moléculas de glutamato, catalisada por GOGAT (Equação 12)



$$NH_4^+ + C_5H_9NO_4 + ATP \rightarrow C_5H_{10}N_2O_3 + ADP + Pi + H_2O \quad \textbf{(11)}$$



$$C_5H_{10}N_2O_3 + C_5H_6O_5 + NADPH \rightarrow 2C_5H_9NO_4 + NADP \quad \textbf{(12)}$$

Embora, as formas amoniacais sejam as fontes nitrogenadas preferenciais das microalgas, a taxa de crescimento microalgal em presença desta forma de nitrogênio é equivalente e até menor que na presença de nitrato. A desvantagem da utilização de amônio/amônia é sua toxidade em potencial, proporcionando efeitos prejudiciais para as microalgas, ainda que em baixas concentrações, como na ordem de 2 mM. O pH é invariavelmente o principal fator que afeta a toxidade do meio, considerando que este parâmetro é determinante para o equilíbrio entre as formas NH_4^+ (não tóxica) e NH_3 (tóxica). Considerando que os nutrientes acessam as células por diferentes meios de transporte, eles podem, assim, controlar as concentrações intracelulares das diferentes formas nitrogenadas. Este controle pode ocorrer se valendo basicamente dos processos de difusão e transporte ativo. No acesso por difusão, a velocidade de penetração passiva de um substrato é linearmente proporcional à concentração extracelular, quando a concentração intracelular é pequena. O fluxo orienta-se da região mais concentrada para a de menor concentração. Quando as concentrações de um lado e do outro da membrana celular tornam-se iguais, o fluxo se detém. Desta forma, por meio deste mecanismo, a concentração endocelular não pode ultrapassar a concentração extracelular. No entanto, certos substratos são acumulados de modo considerável dentro da célula, o que suporia um fluxo no sentido inverso do gradiente de concentração. O processo não é reversível, desta maneira outro processo de penetração de substâncias na célula se faz necessário. O transporte ativo é a forma comum de transporte celular de macromoléculas tais como aminoácidos, açúcares e ácidos orgânicos, os quais são dependentes de permeases (sistemas análogos aos enzimáticos). No entanto, a amônia livre passa por difusão para o interior da célula, em um processo que tem pouco controle sobre as concentrações intracelulares, podendo às vezes tornar-se tóxica, afetando o sistema fotossintético, com danos direcionados ao FSII.

A toxidade do NH_4^+ é consideravelmente menor que a do NH_3. A amônia é considerada uma das substâncias mais tóxicas que afetam a viabilidade do crescimento celular. Todavia, o grau de toxidade depende da espécie. A exemplo, espécies como *Arthrospira platensis* têm demonstrado maior resistência ao nitrogênio amoniacal quando comparadas a outras microalgas. A escolha da espécie com a propriedade de resistência a altas concentrações de amônia é de importância quando se visa à aplicação tecnológica de microalgas. Espécies como a *Aphanothece microscopic*a *Nägeli* têm demonstrado pleno crescimento em efluentes agroindustriais com altas concentrações de nitrogênio amoniacal (Queiroz e Koetz, 1998; Queiroz *et al.*, 2011).

Dentre os nitrogenados, o nitrato (NO_3^-) é a fonte mais comum na natureza, no entanto, para sua utilização, se faz necessário sua redução a amônia, para que seja assimilado pelas microalgas, o que se traduz em gasto energético pelos organismos. Este fato faz do nitrogênio amoniacal a forma de nitrogênio preferencial das microalgas. Sua assimilação ocorre mediante uma sequência de reduções até a amônia, tendo como elemento doador de elétrons a ferridoxina. Esta sequência de reduções é catalisada pelas enzimas nitrato redutase e nitrito redutase, de maneira similar ao que se processa nas plantas superiores.



$$NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NH_4^+ \qquad \textbf{(13)}$$

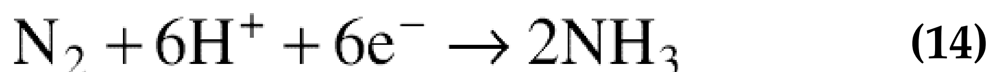
O NO_3^- não apresenta maiores riscos quanto ao efeito tóxico para as microalgas, as quais podem tolerar até 100 nM. Porém, à medida que a concentração aumenta, gera-se um efeito negativo no crescimento celular. Possivelmente a atividade da nitrato redutase é melhorada com o aumento da concentração de NO_3^-, resultando também em um aumento intercelular de nitrito (NO_2^-) e NH_4^+. O NO_2^- é frequentemente encontrado em ambientes naturais como produto intermediário do processo de nitrificação, bem como produto intermediário do metabolismo do nitrogênio. A principal forma de captação destas formas nitrogenadas é por processo ativo, mas pode ocorrer também por difusão.

Além de NO_3^-, NO_2^-, NH_4^+ e NH_3, outros compostos nitrogenados podem ser utilizados pelas microalgas, como o nitrogênio atmosférico (N_2) e o óxido nítrico (NO). A baixa solubilidade do NO, é um fator limitante para a assimilação microalgal. Uma vez dissolvido, em virtude de ser uma

molécula de pequeno tamanho, pode difundir-se diretamente para dentro da célula e lá ser transformado em amônia. Em elevadas concentrações resulta em efeitos prejudiciais às células. O grau de resistência ao NO é dependente da espécie.

5.4.1. Fixação biológica de nitrogênio

A fixação biológica do nitrogênio pode ser definida como a redução do nitrogênio molecular a amônia, sem resultar em produção de energia, mediante catálise de um complexo sistema enzimático, a nitrogenase. O sistema enzimático nitrogenase é basicamente constituído por duas proteínas: a dinitrogenase redutase (Fe-proteína) e dinitrogenase (Fe-Mo-proteína). Estas proteínas não apresentam atividade enzimática por si só, mas interagem, para produzir nitrogenase ativa. A reação requer um baixo potencial redutor, expresso na Equação 14, pela ferridoxina, na forma reduzida e oxidada, e um considerável gasto de energia na forma de ATP. São consumidas 16 moléculas de ATP, para geração de duas moléculas de NH_3.



$$N_2 + 6H^+ + 6e^- \rightarrow 2NH_3 \quad \textbf{(14)}$$

A fixação biológica de nitrogênio é realizada apenas por alguns procariotos, que vivem livres ou associados em simbiose com outros organismos. As Cyanophytas é o maior grupo de procariotos capaz de fixar nitrogênio. Algumas espécies filamentosas, como as representantes dos gêneros *Oscillatoria, Nostoc, Anabaena*, e algumas Heterokontophytas (diatomáceas), como dos gêneros *Rhyzosolenia* e *Hemiculus*, são reconhecidamente capazes de assimilar N_2 como única fonte de nitrogênio.

A nitrogenase é altamente sensitiva ao oxigênio, podendo funcionar apenas em condições anaeróbias. A exposição direta desta enzima ao ar resulta em inativação irreversível de sua capacidade catalítica. Sendo as Cyanophytas primariamente fotossintéticas oxigênicas, o processo de fixação de nitrogênio torna-se incompatível com sua natureza fotossintética. Desta maneira, muitas espécies evoluíram estratégias no sentido de poderem utilizar ambos os processos metabólicos. Para isso, muitas delas se valem da alternativa da separação temporal para executar a fixação de nitrogênio, efetuando a fotossíntese durante o dia e fixando N_2 à noite. Este mecanismo é utilizado por algumas Cyanophytas unicelulares

marinhas, que podem ser capazes de compartilhar com um ambiente oxigenado, mantendo, no entanto, um sistema de nitrogenase ativa, sem a necessidade de diferenciações celulares. Indivíduos do gênero *Synechococcus* são um exemplo desta possibilidade. No entanto, a separação temporal dos processos metabólicos fotossintéticos e fixação de N_2 tem sido constatada, tanto em espécies unicelulares como filamentosas. Outras espécies, para proteger o sistema enzimático, desenvolveram uma adaptação altamente especializada para a célula fixadora de N_2, o heterocisto, permitindo a fixação de N_2 no meio ambiente na presença de O_2.

Os heterocistos são desenvolvidos em algumas espécies geralmente filamentosas, quando em condições limitantes de fontes nitrogenadas, em especial NO_3^- e NH_3/NH_4^+. Resultam da metamorfose de células vegetativas. Independente das membranas citoplasmática e a delimitante do periplasma, quimicamente é constituída a partir de um extrato de polissacarídeos, seguido de uma camada glicolipídica, dificultando assim, a troca gasosa entre a célula e o meio externo e com isso assegurando condições de anaerobiose, necessárias para garantir a atividade da nitrogenase. Em termos morfológicos apresentam uma forma mais arredondada e maior que a célula vegetativa, se distribuindo ao longo do filamento. Existe uma diminuta área de contato entre as células vegetativas e os heterocistos, impedindo a entrada de O_2, mas permitindo o transporte de açúcares da célula vegetativa para o heterocisto. Uma vez que as Cyanophytas heterocistadas não apresentam o FSII, consequentemente, não executam fotossíntese oxigênica. A fonte de carbono utilizada é então obtida através de açúcares providenciados pelas células vegetativas. Embora as microalgas heterocistadas careçam de FSII, elas mantêm o FSI, para suprir a energia necessária para a fixação de nitrogênio. A capacidade de os heterocistos produzirem nitrogenase é uma informação que pode ser considerada recente, tendo sido documentada somente em 1969 (Diez e Ininbergs, 2014).

Conforme já discutido, no item 5.4 (Equação 12), o oxoglutarato, componente intermediário do ciclo do ácido cítrico, tem papel fundamental na assimilação da amônia. Considerando que os heterocistos são formados em condições limitantes de outras formas de nitrogenados (NO_3^-, NO_2^- e NH_3/NH_4^+), por consequência, com a escassez de substrato para reagir com o oxoglutarato, este acumula dentro da célula. O aumento dos níveis de oxoglutarato desencadeia a maturação do heterocisto, em consequência, a nitrogenase é produzida e a célula deixa de produzir a

ribulose 1,5-difosfato carboxilase, inativando o FSII, deixando, portanto, de fixar carbono (item 5.2), mas continua a depender da fosforilação ligada ao FSI para produção de ATP. Há um aumento na taxa respiratória e consequente consumo de O_2, o que torna o ambiente intracelular ideal para a ativação da nitrogenase. Neste contexto, a rota das pentoses desempenha importante papel no processo de fixação de N_2, providenciando energia e poder redutor necessário para que se desenvolva o processo. A amônia produzida (Equação 14) é então incorporada em aminoácidos, em especial na glutamina, que serão transportados para a célula vegetativa.

5.5. Sistemas de cultivo: biorreatores, operação e parâmetros de processo

O cultivo de micro-organismos fotossintéticos apresenta uma demanda única na biotecnologia industrial, que é o aporte adequado de energia luminosa às células. Esta característica modifica substancialmente a configuração dos biorreatores para o cultivo microalgal. Além deste parâmetro de processo a temperatura, a transferência de gases, o pH, a disponibilidade de nutrientes e a agitação são elementos que devem ser fornecidos adequadamente em um cultivo microalgal através dos vasos de reação (Jacob-Lopes *et al.*, 2013).

O cultivo fotossintético microalgal depende essencialmente do aporte da energia luminosa às células. Fenômenos de fotolimitação e fotoinibição são frequentes em culturas iluminadas inadequadamente, ocasionando significativas perdas de desempenho cinético nos biorreatores. Além dos aspectos quantitativos, deve-se considerar a natureza qualitativa da luz incidente nos sistemas. Iluminação natural ou artificial pode ser utilizada em função das características requeridas nos sistemas de cultivo. Aspectos como localidade, variações sazonais, variações ao longo do fotoperíodo claro e ocorrência de fotoperíodos de claro/escuro são as principais questões dos sistemas naturalmente iluminados (Jacob-Lopes *et al.*, 2009a). Em sistemas iluminados artificialmente, a fonte de energia luminosa e o custo da energia são os principais elementos a serem definidos na implementação dos sistemas de iluminação. Alternativamente, os cultivos heterotróficos eliminam integralmente todos os aspectos relacionados com a energia luminosa (Perez-Garcia *et al.*, 2011).

A temperatura é outro importante fator associado aos cultivos microalgais. Em geral a ótima temperatura de cultivo ocorre na região mesófila (25-35°C), embora algumas linhagens termófilas resistam a temperaturas na faixa dos 60°C. A grande maioria dos sistemas de cultivo assume a variação da temperatura como um resultado da variação do ambiente, embora o uso de camisas de aquecimento, serpentinas e trocadores de calor externo possam ser instalados para o controle da temperatura de biorreatores microalgais.

Dependendo da natureza do cultivo, fotossintético ou heterotrófico, gases são transferidos em biorreatores microalgais visando suprir a cultura com dióxido de carbono e/ou oxigênio, além de auxiliarem no controle do pH e na mistura do sistema, favorecendo as transferências de calor e

massa. O mecanismo preferencialmente utilizado para esta operação é o borbulhamento do gás através de difusores diretamente no meio de cultura. Adicionalmente, degaseificadores são frequentemente usados para separar o excesso de oxigênio produzido durantes os cultivos fotossintéticos em biorreatores fechados.

Em termos de pH, o cultivo microalgal é favorecido normalmente em uma faixa que varia do neutro ao alcalino (7-9), embora algumas espécies apresentem crescimento ótimo em pH 4, (*Chlorococcum littorale*) e pH 10 (*Spirulina platensis*). Existe uma complexa relação entre a concentração e tipo da fonte de carbono (dióxido de carbono e/ou fontes exógenas de carbono orgânico) com o pH em culturas fotossintéticas e heterotróficas, respectivamente. Esta relação é estendida às fontes de nitrogênio, uma vez que as especiações de NH_3 e NH_4^+ são fortemente afetadas pelo pH do meio de cultura. Desta forma, mecanismos de controle de pH devem ser integrados aos biorreatores para a manutenção das condições ótimas deste parâmetro no processo.

A composição da biomassa microalgal é predominante composta por carbono, nitrogênio e fósforo, em proporções de aproximadamente 50, 8 e 1%, respectivamente. Consequentemente, a disponibilidade destes nutrientes é essencial para suportar um robusto desempenho celular nos biorreatores. Em nível de cultivo fotossintético, o dióxido de carbono é a principal fonte de carbono usada nos cultivos. Uma vez que a concentração de CO_2 atmosférico (0,034%) não é suficiente para suportar cultivos intensivos, este gás é fornecido através de fontes estacionárias concentradas (dióxido de carbono comprimido, misturas padrão primário e gases de combustão industrial) que permitem a obtenção de concentrações nos gases de entrada dos fotobiorreatores em valores normalmente entre 3 e 15%. Há uma ampla expectativa na disponibilidade e uso de CO_2 oriundo de gases de combustão industrial para o suporte de cultivos fotossintéticos microalgais. Esta abordagem, entretanto, tem enfrentado significativa dificuldade de implementação, uma vez que a natureza destes gases é caracterizada por elevados índices de impurezas (CO, CH_4, NOx, SOx, H_2 e material particulado), além da temperatura dos gases, que normalmente alcança valores acima de 1000°C, duas características que inviabilizam processos de base biológica (Jacob-Lopes e Franco, 2013).

Por outro lado, cultivos heterotróficos requerem uma fonte exógena de carbono orgânico. Tradicionalmente a glicose é o substrato usual, embora outros monossacarídeos, dissacarídeos e polissacarídeos, além de outras fontes de carbono orgânico, como glicerol e resíduos agroindustriais

tenham sido eficientemente usados para este propósito. Desde que eficientemente assimilável, a escolha da fonte de carbono é um critério puramente econômico. Depois do carbono, o nitrogênio é o segundo elemento limitante dos cultivos microalgais. O nitrato é a fonte usual, embora ureia, amônia e fontes orgânicas sejam assimiladas por inúmeras espécies. Fontes nitrogenadas oriundas de águas residuárias têm sido eficientemente usadas para o suporte de cultivos microalgais. Por fim, o fósforo é o terceiro elemento de maior demanda nestes sistemas. O fósforo reativo é a especiação mais facilmente assimilável, embora fósforo ácido-hidrolisável e fósforo orgânico sejam eficientemente usados (Vieira *et al.*, 2012). Igualmente aos demais elementos o uso de resíduos industriais ricos em fósforo tem sido considerado fonte do elemento. Ademais, outros elementos traços podem ser requeridos para crescimento microalgal, dependendo dos requerimentos individuais de cada espécie.

Finalmente, agitação é uma operação necessária no cultivo de micro-organismos fotossintéticos, uma vez que assegura a uniformidade espacial dos vasos de reação, favorecendo a exposição das células à luz, a transferência de calor e estratificação térmica, além de melhorar a troca de gases. Uma mistura adequada minimiza ainda a formação de agregados celulares que aumentam a ineficiência global do biorreator. Embora fundamental para o adequado desenvolvimento do processo, a operação de mistura está relacionada com estresses hidrodinâmicos associados ao cisalhamento celular, que danifica e inibe o crescimento microalgal. Os biorreatores microalgais são normalmente equipados com sistemas de aeração pneumática e agitação mecânica, ou ainda uma combinação entre estes sistemas.

Além destes elementos, deve-se ponderar no projeto e construção dos sistemas de cultivo à biologia da espécie, o custo e a disponibilidade da área, mão de obra, energia, água, nutrientes, as condições climáticas e as características desejadas no produto final. Desta forma, com base nestes aspectos, os sistemas de cultivo de microalgas são classificados em sistemas abertos e sistemas fechados (Molina Grima *et al.*, 1999), conforme esquematizado no Quadro 5.3 e Figura 5.6.

Quadro 5.3 Classificação geral dos biorreatores microalgais

1. Sistemas Abertos
   lagoas circulares
   lagoas de alta taxa (tanques *raceway*)

2. Sistemas Fechados
- fotobiorreatores tubulares
- fotobiorreatores de placas planas
- fotobiorreatores de coluna vertical
- coluna de bolhas
- *air-lift*
- *big-bag*
- biorreatores heterotróficos

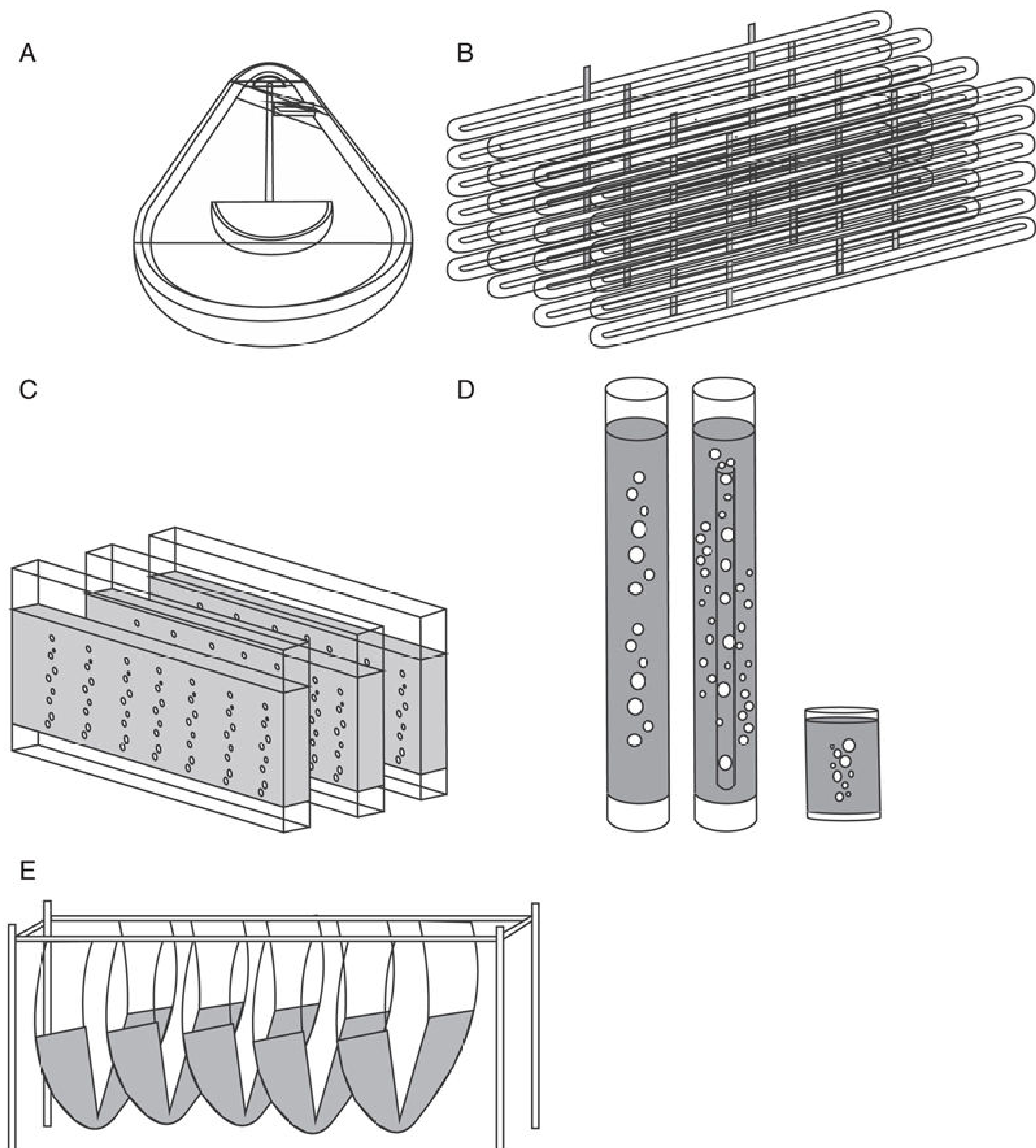


FIGURA 5.6 Configurações de biorreatores microalgais. (a) *raceway*, (b) tubular, (c) placas planas, (d) coluna de bolhas, *air-lift* e heterotrófico e (e) *big-bag*.

Por questões de aumento de escala e custos de capital e operacionais, os sistemas abertos dominam globalmente a operação em larga escala de processos baseados em microalgas. Estes sistemas de cultivo apresentam duas configurações principais: as lagoas circulares e tanques *raceway* (Figura 5.6a), que consistem em um tanque raso (20-30 cm de profundidade), de geometria circular ou oval, dotados de sistemas de

agitação mecânica, que expõem o meio de cultura ao ar por turbilhonamento. Embora de construção simples, estes sistemas são ineficientes como vasos de reação, pois as limitadas transferências de energia luminosa e dióxido de carbono, normalmente conduzem a produtividades baixas. Adicionalmente, ambientes de cultivo abertos ocasionam elevadas taxas de evaporação produzindo significativas variações na composição do meio de cultura, além de permitir o acesso de contaminação externa por predadores e outros organismos competidores. A combinação de todas estas características consolidou o emprego destes sistemas de cultivo para espécies de microalgas que crescem em condições extremas e ambientes seletivos, usadas na produção de bioprodutos de elevado valor comercial (Slegers *et al.*, 2013a).

Os avanços na engenharia de biorreatores microalgais têm sido conduzidos visando contornar as principais limitações dos fotobiorreatores abertos, através do desenvolvimento de reatores fechados. Os biorreatores fechados permitem um maior controle das condições da reação biológica, além de permitirem a condução de cultivos fotossintéticos, mixotróficos e heterotróficos. Três configurações principais dominam os arranjos dos fotobiorreatores fechados: os sistemas tubulares, de placas planas e as colunas verticais.

Os fotobiorreatores tubulares (Figura 5.6b) consistem em um arranjo de tubos transparentes de até 0,1m de diâmetro, construídos em vidro borosilicato ou polímero transparente adequado, dispostos em uma sequência horizontal ou vertical. O meio de cultura é recirculado continuamente ao longo dos tubos, fazendo com que as células sejam expostas à energia luminosa. Geometricamente este arranjo objetiva a obtenção de elevadas razões de superfície por unidade volume, o que permite a obtenção de altas taxas de conversão de dióxido de carbono em bioprodutos. O comprimento dos tubos é determinado pela tolerância ao acúmulo de oxigênio no meio de cultura pela espécie microalgal. Esta configuração, no entanto, é limitada pelos gradientes de concentração ao longo dos tubos, pela formação de biofilmes nas paredes dos tubos e pelo requerimento de elevadas áreas físicas (Slegers *et al.*, 2013b).

Os fotobiorreatores de placas planas (Figura 5.6c) têm recebido considerável atenção para o cultivo de organismos fotossintéticos, devido à elevada área de iluminação superficial. Diversos arranjos construtivos têm sido propostos no sentido de maximizar a transferência de energia luminosa às células, através da redução do caminho percorrido pela luz. A espessura das placas planas varia entre 2 a 4 cm. Embora apresentem adequado desempenho cinético, a elevada compartimentalização e a

necessidade extensiva de materiais de suporte dificultam o escalonamento e a operação destes fotobiorreatores (Slegers *et al.*, 2011).

As colunas verticais (Figura 5.6d), representadas principalmente por fotobiorreatores de coluna de bolhas e fotobiorreatores *air-lift*, são vasos de reação de geometria cilíndrica, com relações altura:diâmetro (h/D) de até 1:10, o que permite a obtenção de elevadas áreas superficiais para a captação da energia luminosa pelas células. Ambos os sistemas são dotados de difusores de gases na base da coluna. Os fotobiorreatores *air-lift* diferem das colunas de bolhas apenas pela presença de um tubo concêntrico ao tudo principal, o que faz com que o líquido no interior do tanque apresente um movimento ordenado de ascensão e queda, melhorando substancialmente a mistura e as taxas de transferência de massa nestes arranjos. São sistemas eficientes do ponto de vista de desempenho cinético, embora limitados sob o ponto de vista de aumento de escala, devido ao baixo volume reacional das unidades individuais, o que requer baterias de colunas verticais dispostas em paralelo na operação de processos de grande porte, onerando efetivamente a construção das instalações (Merchuck *et al.*, 2000).

Em uma alternativa para contornar os custos dos sistemas de coluna de bolhas e *air-lift*, fotobiorreatores do tipo *big-bag* têm sido propostos (Figura 5.6e). Estes reatores consistem em sacos plásticos estéreis de até 0,5 m de diâmetro, ajustados a um sistema de difusão de gases e suspensos em uma estrutura adequada. Embora de baixo custo e fácil construção, são intensivos em mão de obra, e a mistura é pobre, levando a um desempenho cinético baixo.

Finalmente, os biorreatores heterotróficos caracterizam-se como uma configuração alternativa dentro dos cultivos de micro-organismos fotossintéticos, pois se baseiam na capacidade que algumas espécies de microalgas possuem, que é a utilização de substratos orgânicos como fonte de carbono, na ausência de luminosidade. Esta característica contorna praticamente todas as limitações anteriormente citadas, pois possibilita o uso de biorreatores convencionais de mistura perfeita, normalmente colunas de bolhas com relações h/D de 1,0-1,5 (Ramirez-Mérida *et al.*, 2015). Apresentam elevado desempenho cinético e são facilmente escalonáveis. Como principal desvantagem, não permitem a síntese de compostos induzidos pela luz e requerem elevados níveis de assepsia, a fim de evitar competição com outros micro-organismos heterotróficos.

Independente da configuração do biorreator, os bioprocessos baseados em microalgas são conduzidos nos modos de operação convencionais

(descontínuos, descontínuos alimentados, semicontínuos e contínuos), utilizados em biotecnologia industrial.

Os cultivos microalgais descontínuos consistem na inoculação de uma cultura de células em um biorreator contendo o meio de cultura. Impõe-se uma dinâmica no qual as células passam pelas fases de adaptação, logarítmica e estacionária, em um período que varia entre uma a quatro semanas. A separação da biomassa do meio de cultura ocorre quando a população atinge a máxima densidade celular. Após esse período ocorre a assepsia e esterilização do biorreator, para início do próximo ciclo de cultivo. Devido à simplicidade, flexibilidade operacional, segurança em nível de contaminação externa, facilidade de controle, este modo é o mais usado para o cultivo de microalgas. No entanto, é ineficiente do ponto de produtividade.

Os cultivos descontínuos alimentados consistem na adição de um ou mais nutrientes limitantes ao crescimento microalgal ao longo do cultivo, não havendo a retirada de material do biorreator até o final do cultivo. O ambiente parcialmente aberto objetiva prover as células com nutrientes suficientes para prolongar o crescimento celular, reduzindo a limitação pelo substrato em paralelo ao aumento da produção de biomassa e bioprodutos. Devido à diversidade de aplicações, a alimentação pode ocorrer através da alimentação repetitiva ou alimentação estendida, além do uso de vazões intermitentes ou constantes de adição de substrato. Estas estratégias operacionais têm sido amplamente utilizadas na alimentação de fontes exógenas de carbono orgânico em cultivos heterotróficos microalgais.

Adicionalmente, o cultivo semicontínuo caracteriza-se pela retirada periódica de uma fração do meio de cultura do biorreator, sendo imediatamente alimentado um volume equivalente de meio de cultura. Esta operação é repetida até o colapso do sistema. É uma estratégia de cultivo de fácil operacionalidade, embora instável e intensiva em mão de obra, e por isso de baixo potencial de aplicação em grande escala.

Finalmente, os cultivos contínuos são caracterizados pela adição constante de meio de cultura em paralelo a remoção simultânea de volume equivalente do interior do biorreator. Este modo operacional permite a manutenção da cultura em um ambiente constante, denominado de estado estacionário. Consequentemente, ao longo do tempo de residência, as células podem ajustar os elementos do metabolismo para um ótimo crescimento, proporcionando elevados ganhos de produtividade ao processo. No entanto, os cultivos contínuos requerem biorreatores e acessórios de maior complexidade, ocasionando maior investimento inicial

da planta. Além disso, em função da abertura do sistema, existe a potencialização da ocorrência de contaminações externas e fenômenos de mutação/degenerescência. Algumas variantes dos sistemas contínuos, como o reciclo de células e os biorreatores em série de múltiplos estágios, são estratégias consideradas promissoras no cultivo microalgal (Jacob-Lopes *et al.*, 2009b).

A Figura 5.7 ilustra o efeito do modo de operação do biorreator no cultivo heterotrófico da cianobactéria *Phormidium autumnale* em efluente agroindustrial, evidenciando significativos ganhos de desempenho na conversão de substrato em biomassa, em função da estratégia de cultivo adotada.

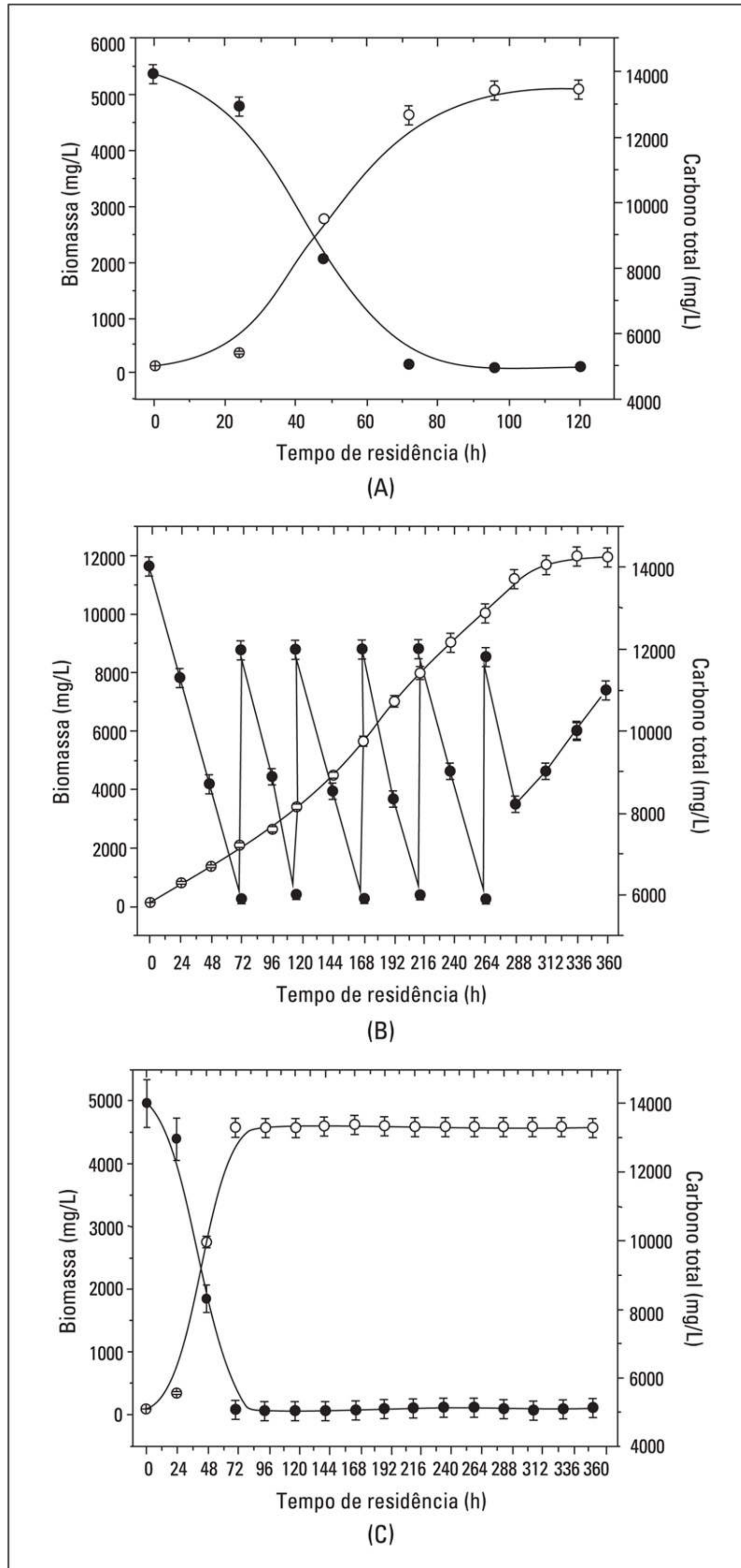


FIGURA 5.7 **Cultivo heterotrófico de *Phormidium autumnale* em modo de operação descontínuo (A), descontínuo alimentado (B) e contínuo (C). Círculos fechados: concentração**

de carbono orgânico, círculos abertos: concentração de biomassa. *Fonte*: Adaptado de Francisco *et al.* (2015).

5.6. Aplicações de micro-organismos fotossintéticos

A mediação de até três rotas metabólicas em paralelo: fotossíntese, respiração e fixação de nitrogênio, por algumas espécies de microalgas em condições específicas, possibilita um amplo potencial de aplicação destes micro-organismos. Aplicações ambientais, produção de alimentos e rações, produção de fertilizantes, produção de bioenergia e produção de moléculas bioativas são as principais explorações tecnológicas de processos baseados em microalgas.

5.6.1. Aplicações ambientais

O tratamento de águas residuárias e gases poluentes industriais é uma aplicação amplamente considerada quando microalgas são utilizadas como biocatalisadores, em processos de contenção ambiental. Além das potencialidades ambientais associadas a processos mediados por microalgas, há um benefício paralelo, que está relacionado com a reutilização da biomassa e/ou bioprodutos formados através da conversão dos poluentes presentes nos efluentes industriais e domésticos. Esta abordagem processual permite um direcionamento efetivo na direção do desenvolvimento sustentável.

A primeira aplicação com este propósito data de meados do século XX, no qual lagoas de alta taxa foram desenvolvidas para a conversão de nitrogênio e fósforo de águas residuárias (Oswald e Gotaas, 1957). Estas lagoas consistem essencialmente em fotobiorreatores abertos (tanques *raceway*), no qual o meio sintético usado para o cultivo microalgal é substituído por uma água residuária com concentrações de matéria orgânica, nitrogênio e fósforo total, que são convertidas em bioprodutos do metabolismo fotossintético, principalmente biomassa microalgal. Microbiologicamente, um consórcio entre microalgas e bactérias aeróbias heterotróficas atua na estabilização do material orgânico e nutrientes do efluente. Esta simbiose é favorecida pela supersaturação do oxigênio produzido pelas microalgas durante a fotossíntese, no qual a concentração pode atingir até 20 g_{O2}/m^3. Esta oxigenação promove a oxidação bacteriana do material orgânico biodegradável presente no efluente, ao mesmo tempo em que as microalgas convertem o nitrogênio e o fósforo fotossinteticamente. Tecnologicamente, estes processos são limitados pelas

proporções de carbono e nitrogênio (razão C/N) presentes nas águas residuárias, o que ocasiona, muitas vezes, baixas eficiências de remoção. No caso de esgotos domésticos, por exemplo, as razões C/N médias são de 3/1, o que equivale à metade do valor teoricamente estipulado como ideal, 6/1. Esta desproporção causa ainda alterações no equilíbrio do sistema carbonato, com liberação paralela de íons hidróxido, levando a um nocivo aumento do pH do efluente, que pode atingir valores superiores a 10. Nestas condições, o metabolismo do consórcio microbiano é severamente inibido. Alternativamente, a adição de uma fonte de carbono inorgânico, normalmente CO_2, pode ser considerada, no sentido de ajustar as razões C/N do efluente. Esta estratégia acaba, no entanto, limitada pela disponibilidade do dióxido de carbono, já discutida anteriormente. Independente destas considerações, as lagoas de alta taxa são arranjos simples e de baixo custo capital e operacional. Em efluentes adequados, apresentam elevadas taxas de conversão de material orgânico e nitrogênio, além que quantidades apreciáveis de fósforo total, em paralelo a uma substancial produção de biomassa microbiana, que pode ser separada do efluente e reutilizada, em função da sua composição química, para diversos fins comerciais, como fertilizante, rações e biocombustíveis. Como desvantagem principal, a construção destes sistemas exige grandes áreas para a implementação, uma vez que a profundidade das lagoas oscila entre 0,15-0,5 m, resultando em baixos volumes de trabalho, além de o desempenho estar fortemente associado às condições climáticas do local.

Em uma segunda aplicação, as microalgas podem ser utilizadas no tratamento de águas residuárias com base em seu metabolismo heterotrófico. Contrariamente aos sistemas de base fotossintética, os biorreatores heterotróficos microalgais operam em completo escuro. Estes biorreatores são uma variante dos fermentadores convencionais, usados amplamente em bioprocessos para o cultivo de bactérias e fungos. Desta forma, algumas espécies de microalgas, quando expostas a condições limitantes de energia luminosa e na presença de uma fonte de carbono orgânico, passam a assimilar imediatamente estes substratos como fonte de carbono. Simultaneamente, altas taxas de conversão de nitrogênio e fósforo total ocorrem nesses reatores. Neste sentido, reduções nas concentrações de material orgânico, nitrogênio e fósforo, em uma única operação unitária, a valores que atinjam os padrões de emissão das mais exigentes legislações ambientais, são sem dúvida o principal diferencial desta rota tecnológica. Esta técnica tem sido eficientemente comprovada em diversas águas residuárias agroindustriais (efluente do processamento de cereais e tubérculos, laticínios, carnes e pescados) e em esgotos

domésticos (Queiroz *et al.,* 2007; Francisco *et al.,* 2015; Vieira *et al.,* 2012; Maroneze *et al.,* 2014; Queiroz *et al.,* 2013; Martinez *et al.*, 2000). A aplicabilidade destes processos também está diretamente associada às relações C/N, cujos valores ótimos situam-se em uma faixa de 20-50. A principal vantagem desta rota tecnológica está associada à possibilidade de uso de reator com relações altura/diâmetro (h/D) baixas em comparação com os fotobiorreatores fechados, convencionalmente usados para mediar reações fotossintéticas. Relações h/D na ordem de 1,0-1,5 permitem a construção de biorreatores com elevados volumes de trabalho, potencializando o escalonamento dos processos. O reuso da biomassa e/ou bioprodutos para diversos fins é outro aspecto atrativo, embora a estabilidade biológica devido à competição com outros organismos heterotróficos seja considerada a principal limitação da técnica.

A mitigação de gases de efeito estufa, particularmente CO_2 e NOx, é outra aplicação ambiental amplamente difundida dos micro-organismos fotossintéticos. Esta abordagem tecnológica fundamenta-se no metabolismo preferencial destes organismos, no qual o dióxido de carbono é convertido em produtos da fotossíntese na presença de luz. A tolerância a elevadas concentrações de dióxido de carbono associada ao amplo espectro de absorção de energia luminosa são dois elementos biológicos que permitem este tipo de aplicação tecnológica. Desta forma, algumas espécies de microalgas podem captar energia luminosa em uma faixa espectral correspondente ao espectro de absorção das clorofilas, carotenoides e ficobiliproteínas potencializando a capacidade de captação da energia luminosa. Adicionalmente, a possibilidade de mediação de até cinco sistemas de bioconversão de carbono inorgânico em paralelo (três transportadores de HCO_3^- e dois sistemas de consumo de CO_2) através de um mecanismo de concentração de carbono permite a obtenção de elevadas taxas fotossintéticas desses sistemas. Ainda em nível metabólico, quatro rotas de biotransformação de carbono podem ocorrer, o que inclui uma química (mineralização de carbonatos e bicarbonatos) e três bioquímicas (fixação em biomassa, produção de exopolímeros e produção de compostos orgânicos voláteis). Tecnologicamente estes processos têm sido limitados pela engenharia de escala dos fotobiorreatores, uma vez que não há uma configuração consensual para estes sistemas reativos (Jacob-Lopes *et al.,* 2008). A principal barreira está associada à necessidade de construir reatores de elevada área superficial, que permita o aporte adequado de luz às células. Estas configurações, no entanto, se refletem em baixos volumes de trabalho, o que torna praticamente improvável a aplicação em grande escala destes processos, uma vez que inúmeros

reatores em paralelo seriam necessários para obtenção de capacidades de eliminação compatíveis com as demandas industriais. Além dos aspectos de iluminação, as fontes industriais estacionárias de CO_2 são normalmente inadequadas para suportar um processo microalgal, devido às altas temperaturas e presença de contaminantes. Por outro lado, a possibilidade de converter CO_2 em produtos atrativos comercialmente, permitiria a valorização dos resíduos industriais, em uma contribuição efetiva para a sustentabilidade da atividade industrial.

5.6.2. Produção de alimentos e rações

Micro-organismos em geral, incluindo microalgas, têm sido extensivamente utilizados na alimentação humana e animal ao longo da história. Esta iniciativa tem sido intensificada nas últimas décadas devido aos benefícios associados à produção de alimentos por processos de engenharia bioquímica (Anupama e Ravindra, 2000).

O termo proteína unicelular refere-se ao uso de células microbianas (biomassa) desidratadas, produzidas natural ou biotecnologicamente, e usadas como fonte de nutrientes para alimentação humana e animal. Não somente proteínas, mas os demais constituintes da biomassa (carboidratos, lipídeos, minerais e pigmentos) estão incluídos nesta terminologia.

A fundamentação desta aplicação baseia-se na composição química da biomassa microalgal (Tabela 5.1). Em geral as microalgas apresentam uma composição predominantemente proteica (40-70%), seguida de substanciais quantidades de carboidratos (10-25%), lipídeos (5-30%), minerais (5-25%) e pigmentos (1-5%). Estes valores são generalizações de uma imensa gama de espécies de microalgas distribuídas nos mais diversos ecossistemas da biosfera. Além disso, a composição da biomassa de uma mesma espécie é fortemente influenciada pelas condições de cultivo, podendo-se induzir a produção de um determinado constituinte celular em detrimento de outro.

Tabela 5.1
Composição química da *Arthrospira platensis*

Nutriente	Valor (/100g)
Energia (kcal)	290
Proteína (g)	57,5
Lipídeos (g)	7,7
Carboidratos (g)	24,0
Minerais	
Cálcio (mg)	120,0
Ferro (mg)	28,5
Magnésio (mg)	195,5
Fósforo (mg)	118,0
Potássio (mg)	1363,0
Sódio (mg)	1048,0
Zinco (mg)	2,0
Cobre (mg)	6,1
Manganês (mg)	1,9
Selênio (μg)	7,2
Vitaminas	
C (mg)	10,1
B6 (mg)	0,36
A (IU)	570,0
E (mg)	5,0
K (μg)	25,5
Tiamina (mg)	2,4
Riboflavina (mg)	3,7
Niacina (mg)	12,8
Ácido pantotênico (mg)	3,5
Ácido fólico (μg)	94,0
Colina (mg)	66,0
Ácidos Graxos	
Ácido mirístico (g)	0,075
Ácido palmítico (g)	2,50
Ácido esteárico (g)	0,077
Ácido palmitoleico (g)	0,328
Ácido oleico (g)	0,347
Ácido linoleico (g)	1,25
Ácido gama-linolênico (g)	0,82
Aminoácidos	
Triptofano (g)	0,93

Nutriente	Valor (/100g)
Treonina (g)	2,97
Isoleucina (g)	3,21
Leucina (g)	4,95
Lisina (g)	3,02
Metionina (g)	1,15
Cistina (g)	0,66
Fenilalanina (g)	2,77
Tirosina (g)	2,58
Valina (g)	3,51
Arginina (g)	4,15
Histidina (g)	1,08
Alanina (g)	4,51
Ácido aspártico (g)	5,80
Acido glutâmico (g)	8,38
Glicina (g)	3,10
Prolina (g)	2,38
Serina (g)	3,0

Fonte: Adaptado de National Nutrient Database for Standard Reference (http://ndb.nal.usda.gov/)

Além dos aspectos quantitativos, os constituintes celulares apresentam características qualitativas que consolidam o valor biológico e nutricional destas biomassas. Em termos proteicos, por exemplo, os perfis aminoacídicos das principais espécies cultivadas comercialmente, normalmente apresentam escores químicos compatíveis com o padrão FAO/WHO (1985), indicando a presença de todos os aminoácidos essenciais em concentrações equivalentes ou superiores à referência. Em relação à fração lipídica, o perfil de ácidos graxos está associado à presença de importantes ácidos graxos poli-insaturados, como os ácidos linolênico, linoleico, araquidônico (ARA), *docosahexaenoico (DHA) e* eicosapentaenoico (*EPA)*.

Independente destas características, as proteínas celulares de origem microalgal têm sido utilizadas não somente para o crescimento, multiplicação e manutenção das estruturas corporais, mas também estão associadas a usos terapêuticos de promoção à saúde. A funcionalidade destas biomassas está relacionada com a presença de inúmeros compostos bioativos de comprovada ação biológica. A seção 5.5.5 discute em detalhes a atividade biológica destas moléculas.

Embora a biomassa microalgal seja uma excelente fonte de nutrientes e compostos bioativos, algumas limitações estão associadas ao seu consumo.

A presença de espessas paredes celulares em algumas espécies direciona a baixas digestibilidades. Outro aspecto a ser considerado refere-se ao teor de ácidos nucleicos. Dietas ricas nestes compostos levam à produção de ácido úrico, que se acumula no corpo humano devido à falta da enzima urato oxidase. Desta forma, ingestões acima de 2 g/dia de ácidos nucleicos estão associadas à formação de pedras nos rins e gota. Adicionalmente, algumas espécies de microalgas, particularmente cianobactérias, produzem potentes toxinas como metabólitos secundários. Estas cianotoxinas apresentam atividade hepatotóxica, neurotóxica, citotóxica e dermatotóxica, com deletérios efeitos para a saúde humana. Finalmente, deve-se considerar a possibilidade da presença de contaminantes químicos derivados dos substratos usados nos cultivos, que podem ocasionar reações alérgicas, gastrointestinais e até cancerígenas.

Neste sentido, o uso seguro destas proteínas unicelulares requer que os padrões de identidade e qualidade sejam compatíveis com o de fontes convencionais de alimentos e rações. Assim, os produtos finais poderão requerer, muitas vezes, extensivas operações de purificação e sanitização antes da liberação para o consumo.

5.6.3. Produção de fertilizantes e condicionadores de solo

O interesse crescente na produção natural e orgânica tem pressionado o desenvolvimento de tecnologias ambientalmente corretas para uma agricultura sustentável. A depleção na fertilidade dos solos, a baixa eficiência no uso de fertilizantes químicos, o aumento da poluição ambiental e o declínio da produtividade de importantes culturas agrícolas estão associados à necessidade de desenvolver e implementar técnicas de biofertilização, que promovam uma redução no uso de fertilização química em paralelo ao aumento da eficiência do uso destes nutrientes. Desta forma, práticas integradas e sustentáveis de gerenciamento de nutrientes estão mundialmente em curso. O uso de microalgas, preferencialmente as cianobactérias, seja de vida livre ou simbioticamente associadas a outros organismos é considerado uma alternativa em potencial para suprir as práticas da agricultura orgânica.

Existem três tipos de materiais que podem ser utilizados para aumentar a produtividade de cultivos agrícolas: os fertilizantes, os corretivos e os condicionadores de solo. Os micro-organismos fotossintéticos, em função do seu metabolismo e composição química da biomassa permitem a

exploração tecnológica para fins de fertilização e condicionamento de solos agricultúráveis.

Independente da rota metabólica adotada nos cultivos, fotossintética ou heterotrófica, a biomassa microalgal apresenta substancial composição mineral, que pode alcançar 25% do peso seco da biomassa. Adicionalmente, a presença de elementos minerais de importância comercial como nitrogênio (N), fósforo (P) e potássio (K) potencializa o uso destes biossólidos na formulação de fertilizantes orgânicos. Deve-se considerar que a composição mineral das biomassas microalgais é fortemente influenciada pela composição mineral do meio de cultura, no qual mecanismos físico-químico-biológicos permitem a transferência destes elementos para os interstícios e interiores celulares, disponibilizando-os para a formulação de adubos organominerais (Tabela 5.2).

Tabela 5.2

Composição mineral de *Phormidium autumnale* determinada por espectrometria de emissão ótica com plasma indutivamente acoplado (ICP-OES) em cultivos fotossintético (meio sintético BG11) e heterotrófico (efluente agroindustrial)

Elemento (μg/g)	Cultivo fotossintético	Cultivo heterotrófico
Ag	5,6	6,40
Al	64,7	111,0
As	5,97	5,97
Ba	4,8	11,0
Be	0,014	0,01
Bi	6,9	6,90
Ca	1164,0	3302,0
Cd	0,90	0,90
Co	0,90	0,91
Cr	4,3	3,3
Cu	16,8	42,6
Fe	1833,0	1266
Li	0,51	0,51
K	2444,0	26042
Mg	678,0	3302
Mn	72,4	120
Mo	2,2	15,8
Na	16488,0	103757
Ni	1,3	1,32
P	1452,0	13876
Pb	2,7	2,72
S	2147,0	8629
Sb	12,6	12,6
Se	5,9	5,9
Sn	0,98	0,97
Sr	4,2	20,0
Ti	2,4	4,5
V	0,10	0,1
Zn	28,4	71,9

Fonte: Adaptado de Santos (2013).

A viabilidade de reuso dos minerais destas biomassas tem sido abordada a partir da extração dos compostos comercialmente mais atrativos, como a fração proteica e lipídica. Desta forma, a biomassa

desengordurada e/ou desproteinada é processada a fim de permitir a obtenção de um biofertilizante adequado ao uso direto. Os diagramas de processamento são variados, mas incluem normalmente operações preliminares, espessamento, estabilização, condicionamento, redução de água, secagem, processamento e redução de volume. Por outro lado, a incorporação direta da biomassa no solo resulta em uma forma econômica e prática de descarte de resíduos sólidos, embora sua capacidade imediata de melhorar as propriedades físico-químicas do solo seja pouco significativa.

Em outra abordagem tecnológica, restrita a uma divisão específica de microalgas, a Cyanophyta, existe a possibilidade de aumentar o desempenho de cultivos agrícolas, através da manipulação destes micro-organismos em vida livre. Além de fixarem nitrogênio e carbono atmosférico, promovem a liberação de nutrientes, modificam a disponibilidade das espécies fosforadas, liberam exopolímeros melhoradores da estrutura física do solo e reduzem as taxas de perda de água e erosão do solo, tonando-se assim, eficientes elementos de condicionamento de solos.

A maioria das cianobactérias diazotróficas (fixadoras de nitrogênio) possuem estruturas celulares especializadas, os heterocistos, que atuam nos sítios de fixação de nitrogênio, responsáveis pela manutenção de condições anaeróbicas imprescindíveis à enzima nitrogenase. Alternativamente, formas filamentosas e coloniais microaeróbias/anaeróbias são desprovidas de heterocistos, mas ainda capazes de fixar o nitrogênio atmosférico. Estes micro-organismos constituem a flora ordinária de muitas terras agriculturáveis, e sua ocorrência é determinada pelo pH, condutividade elétrica e disponibilidade de sódio intercambiável do solo.

Numericamente, os balanços de nitrogênio revelam que cianobactérias nativas fixadoras de nitrogênio, distribuídas no solo, podem prover entre 25-30 kg/ha a cada seis meses. Paralelamente, até 500 kg/ha de biomassa e 670 kg/ha de carbono orgânico podem ser formados e incorporados no solo, respectivamente. A estrutura dos complexos solo-planta-micro-organismos aumenta a produtividade das culturas agrícolas em até 30% (Prasanna *et al*., 2014).

O sucesso do estabelecimento destas culturas nativas depende fundamentalmente do tipo do solo. Em termos tecnológicos, entretanto, é possível inocular culturas de cianobactérias em solos desprovidos destes micro-organismos. A inoculação induz a significativas proliferações microbianas, capazes de incrementar o desempenho agrícola dos solos. A

operação de distribuição e fixação dos inóculos cianobacterianos, é a principal limitação tecnológica deste método de biofertilização, já que além de produção e distribuição, a viabilidade das culturas até o completo estabelecimento dos consórcios microbianos é outro fator decisivo. As culturas inoculadas sofrem uma intensa competição com outros organismos predadores do ecossistema, como nematoides e moluscos, que devem ser adequadamente controlados visando à manutenção da eficiência do inóculo e seu efetivo estabelecimento no solo.

A principal metodologia para preparação de carreadores e formulações de biofertilizantes a partir de cianobactérias fixadoras de nitrogênio inclui o uso do próprio solo a ser inoculado como agente carreador. Uma mistura de cepas é cultivada, por períodos entre 3 e 4 semanas, em biorreatores com condições físico-químicas adequadas. Aproximadamente 10 kg do preparado são necessários para cada hectare a ser inoculado. Embora esta abordagem seja simples e econômica, algumas limitações relacionadas com a contaminação pela flora nativa competidora do solo e as dificuldades logísticas devem ser consideradas. Alternativamente, outros agentes carreadores como resíduos vegetais (palha de trigo e arroz), argilas industriais (atapulgita e bentonita), fibra de coco e blendas de solo:compostagem e carvão vegetal:compostagem, em proporções de 1:1, têm sido extensivamente testadas, visando o desenvolvimento de formulações técnico-economicamente viáveis para a fertilização de solos. Estas metodologias alternativas visam reduzir a quantidade de inóculo requerida por hectare, sem o comprometimento do estabelecimento das culturas no solo, além de facilitar o transporte e distribuição do material inoculante.

5.6.4. Produção de bioenergia

O suprimento de quantidades suficientes de energia com o mínimo impacto ambiental está entre os principais desafios do mundo macroenergético. A busca por substitutos de energia fóssil, que cumpram com os requisitos de sustentabilidade energética, direciona o desenvolvimento dos biocombustíveis.

Neste sentido, os micro-organismos fotossintéticos têm sido considerados alternativas potencialmente atrativas para o desenvolvimento de novas matrizes energéticas. O uso de microalgas na produção de combustíveis está associado a elevadas produtividades por unidade de área, uso de matérias-primas não alimentícias, uso de terras não agricultúraveis, uso de fontes de água não potáveis (águas do mar e

salobras, efluentes industriais e esgotos urbanos), produção paralela de coprodutos e potencial para a mitigação de poluentes.

Desta forma, a biomassa e os bioprodutos de origem microalgal, quando processadas por operações físicas, químicas e/ou biológicas, podem fornecer diferentes tipos de biocombustíveis, incluindo primariamente o biodiesel, biohidrogênio, bioetanol e biometano (Figura 5.8).

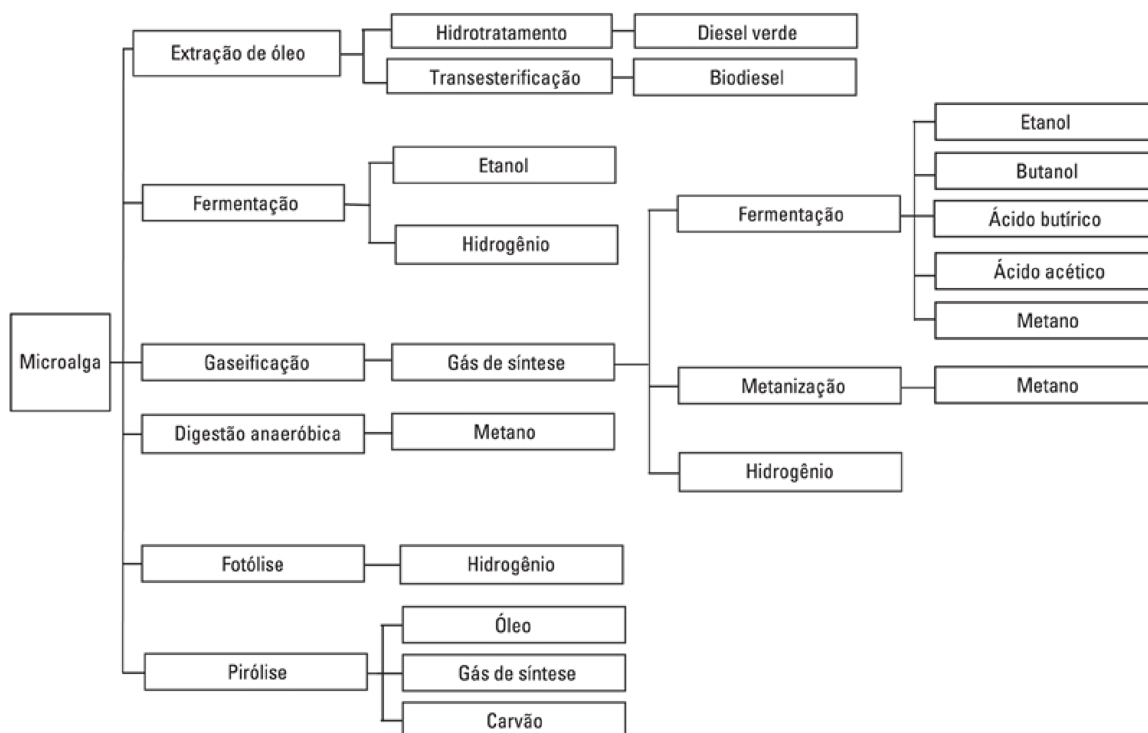


FIGURA 5.8 Rotas de produção de biocombustíveis a partir de microalgas.

O biodiesel é definido como o derivado mono-alquil éster de ácidos graxos de cadeia longa, proveniente do óleo microalgal, cuja utilização está associada a motores de ciclo diesel. Esta tecnologia é referida como biocombustíveis de terceira geração (3G). As microalgas podem sintetizar diversos tipos de lipídeos celulares (*single-cell oils*), incluindo lipídeos neutros, lipídeos polares, ésteres de ceras, esteróis e hidrocarbonetos, além de prenil derivados como tocoferóis, carotenoides, quinonas e derivados pirrólicos fitalados como as clorofilas. Comparado aos óleos vegetais, estes lipídios possuem uma composição diversificada de ácidos graxos, com elevados níveis de insaturação. O tamanho da cadeia e o nível de insaturação dos ácidos graxos determinam diretamente a qualidade de combustão do biodiesel. Um biodiesel de alta qualidade deve apresentar

estabilidade oxidativa e desempenho adequado em baixas temperaturas, que são propriedades obtidas em óleos com reduzidos níveis de ácidos graxos poliinsaturados e saturados. Além da espécie, o perfil de ácidos graxos dos óleos microalgais depende fundamentalmente das condições de cultivo. Em condições normais, a maioria das microalgas acumulam lipídeos em até 20% de seu peso seco, principalmente por esterificação de glicerolipídeos de membrana. No entanto, quando submetidas a condições de estresse, as células podem alterar as rotas metabólicas na direção do acúmulo de lipídeos neutros, que podem alcançar até 50% do peso seco, principalmente na forma de triacilgliceróis. Independente destas considerações, como os óleos unicelulares estão localizados no interior das células, a produtividade lipídica, que é o produto entre a produtividade celular e o teor de lipídeos da célula, é o principal indicador de potencial de produção de biodiesel por um processo baseado em microalgas.

Desta forma, devido à localização na célula, a extração dos lipídeos microalgais é considerada uma operação limitante do processo. Estas separações podem ocorrer por inúmeras operações unitárias, embora a extração por solventes seja a técnica mais utilizada, em função de aspectos relacionados com o custo-benefício. Após a extração, uma etapa de fracionamento pode ser inserida no processo, visando à separação das frações lipídicas indesejáveis. Posteriormente, o produto purificado é convertido em biodiesel através de reações de transesterificação, que são preferencialmente adotadas em função do custo e qualidade do combustível. A Tabela 5.3 demonstra algumas propriedades de combustão de diferentes biodieseis de origem microalgal, evidenciando a adequação qualitativa deste tipo de combustível.

Tabela 5.3

Propriedades de combustão de diferentes biodieseis (conteúdo de ésteres [CE], número de cetano [NC], índice de iodo [II], grau de instauração [GI] e ponto de entupimento de filtro a frio [PEFF]) e padrões normativos nacionais e internacionais

Biodiesel	CE (%)	NC	II(gI2/100g)	GI (%)	PEFF (°C)
Microalga em cultivo fotossintético					
Phormidium[1]	99,8	54,6	74,5	76,3	4,4
Aphanothece[1]	99,9	55,8	65,4	70,6	-4,6
Aphanothece[2]	99,7	51,3	79,9	65,3	24,9
Microalga em cultivo heterotrófico					
Phormidium[3]	99,8	57,7	41,9	45,8	46,5
Phormidium[4]	99,8	58,5	67,2	71,3	6,7
Phormidium[5]	99,8	55,0	73,5	74,6	5,0
Oleaginosa					
Soja[6]	96,9	49,0	128,0	143,8	-5,0
Palma[6]	97,7	61,0	57,0	64,2	10,0
Canola[6]	99,5	55,0	109,0	121,9	-10,0
Padrões normativos					
ASTM 6751	-	mínimo 47	-	-	-
EN 14214	mínimo 96,5	mínimo 51	máximo 120	-	-
ANP 255	-	mínimo 45	-	-	-

Fonte: Adaptado de Francisco et al. (2010), Jacob-Lopes e Franco (2013), Francisco et al. (2015), Siqueira et al. (2015), Maroneze et al. (2014) e Knothe (2005).

[1] cultivo fotossintético (dióxido de carbono puro);

[2] cultivo fotossintético (dióxido de carbono oriundo do gás de purga de unidades de geração de hidrogênio);

[3] cultivo heterotrófico em manipueira;

[4] cultivo heterotrófico em sacarose;

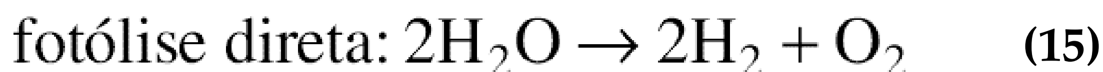
[5] cultivo heterotrófico em efluente do abate e processamento de bovinos.

A transesterificação é uma reação entre um triacilglicerol e um aceptor acil, que pode ser um ácido carboxílico, um éster ou preferencialmente um álcool. A reação é catalisada quimicamente (ácido ou base) ou

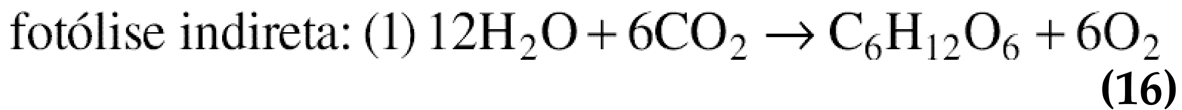
biologicamente (enzimas), ou não catalisada, desde que conduzida a alta pressão, embora a catálise ácida seja normalmente empregada em função do conteúdo de água e acidez dos óleos microalgais. Alternativamente, a produção de diesel verde é outra rota tecnológica possível, conduzida através do processo de hidrotratamento catalítico. Nestes processos, o hidrogênio substitui o álcool usado na transesterificação convencional, gerando coprodutos como propano, água e dióxido de carbono, ao invés de glicerol. O diesel verde é considerado um combustível superior ao biodiesel em função dos baixos teores de oxigênio, que são bastante similares ao petrodiesel.

Finalmente, deve-se considerar a possibilidade da excreção espontânea de óleos unicelulares por algumas espécies de microalgas. Nestas espécies de fina parede celular, a síntese de biodiesel torna-se ainda mais fácil, uma vez que operação de separação do óleo é excluída do processo. A clorofícea *Botryococcus braunii* é o exemplo mais representativo desta possibilidade, embora a manipulação genética de outras espécies esteja sendo amplamente desenvolvida para este propósito.

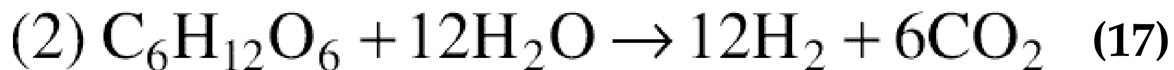
O biohidrogênio é outro combustível passível de obtenção por processos baseados em microalgas. Por ser um combustível isento de emissões, é considerado o mais ambientalmente correto de todos os elementos carreadores de energia existentes. A produção de hidrogênio microalgal está relacionada com reações bioquímicas e fotoquímicas em anaerobiose ou aerobiose. A produção ocorre durante a fotossíntese a partir da água, através dos fotossistemas I e II, onde o carbono reduzido produzido é fermentado na ausência de luz e a oxidação enzimática dos redutores intracelulares derivados da fermentação é fotofermentada. Estes micro-organismos fotossintéticos modulam duas classes de metaloenzimas, nitrogenases e hidrogenases, que estão intimamente relacionadas com os processos de geração de biohidrogênio durante estas reações. A produção biológica de hidrogênio difere entre estas enzimas em termos de balanço de energia, uma vez que as hidrogenases são até 3 vezes mais eficientes que as nitrogenases, considerado o gasto de energia na forma de ATP. Por outro lado, as nitrogenases são relativamente menos sensíveis ao oxigênio, o que impõe um controle mais rigoroso das condições de cultivo para a ótima produção de hidrogênio. As Equações 15 a 17 ilustram as reações de fotólise mediadas por microalgas.



$$\text{fotólise direta: } 2H_2O \rightarrow 2H_2 + O_2 \qquad \textbf{(15)}$$



$$\text{fotólise indireta: (1) } 12H_2O + 6CO_2 \rightarrow C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \quad \textbf{(16)}$$



$$(2)\ C_6H_{12}O_6 + 12H_2O \rightarrow 12H_2 + 6CO_2 \quad \textbf{(17)}$$

Independente dos aspectos bioquímicos, estas rotas tecnológicas podem ser manipuladas através de técnicas de engenharia bioquímica, no sentido de otimizar a produção da molécula alvo. Além da seleção da espécie, a privação de nitrogênio e enxofre, adição de inibidores ou o uso de ciclos alternados de claro:escuro são as estratégias mais empregadas para a biossíntese de hidrogênio. Deve-se considerar que embora a produção deste biocombustível seja potencialmente atrativa por estas vias de transformação, a produção em escala de campo não tem demostrado a mesma maturidade dos cultivos laboratoriais. As inibições e/ou limitações da iluminação natural são frequentemente citadas como o principal obstáculo a ser ultrapassado. Progressos têm sido obtidos através da consolidação das técnicas de cultivo (imobilização celular, condições de estresse pela luz e componentes químicos do meio de cultura), além de recursos de engenharia genética que visam adaptar os fotossistemas para as condições impostas a uma cultura a campo.

O bioetanol é outro combustível passível de obtenção por processos mediados por microalgas. Sua produção ocorre através da fermentação de substratos fermentescíveis, normalmente um carboidrato simples, que após a fermentação produz álcool como um produto da reação biológica, que é posteriormente separado e concentrado para uso como combustível. Desta forma, a viabilidade desta rota de produção depende fundamentalmente da disponibilidade de carboidratos acumulados intracelularmente. Conforme já relatado, a biomassa microalgal apresenta em média teores de 25% de carboidratos, com perfis que contemplam desde monossacarídeos até polissacarídeos. Em adição, algumas culturas em condições específicas são capazes de excretar polissacarídeos exocelulares para o meio de cultivo, aumentando ainda mais a disponibilidade destas estruturas orgânicas fermentescíveis. O processo de produção normalmente exige operações preliminares de extração e hidrólise dos carboidratos, que só então estarão disponíveis para a conversão em etanol por bioprocessos mediados por leveduras.

Alternativamente, as microalgas podem biossintetizar álcoois e excretar diretamente através das paredes celulares, por meio de cultivos heterotróficos em condições de completo escuro. Os carboidratos

endógenos ou as fontes de carbono orgânico exógeno são convertidos a piruvato através das rotas de Embden-Meyerhof-Parnas e o ciclo das pentoses fosfato através das enzimas piruvato descarboxilase e álcool desidrogenase, produzindo finalmente álcoois como produto final da reação (Jacob-Lopes et al., 2015).

A produção de biogás é outro vetor bioenergético dos processos mediados por microalgas. O biogás é uma mistura de metano (55-75%) e dióxido de carbono (25-45%), produzidos através de processos de digestão anaeróbia. É uma rota tecnológica amplamente utilizada para a produção de combustíveis de transporte, geração de eletricidade e energia térmica. A composição química e o valor energético da biomassa microalgal determinam sua utilização como insumo para a produção de biogás. A ausência de lignina, os baixos teores de celulose, além do conteúdo em proteínas, carboidratos e lipídeos potencializa os processos de digestão anaeróbia (Tabela 5.4).

Tabela 5.4

Valor calorífico de algumas biomassas de interesse energético

Biomassa	Valor calorífico (kJ/kg)
Chlorella sp.	14,6
Spirulina platensis	12,1
Bagaço de cana	19,4
Miscanthus	19,6
Switchgrass	19,1
Eucalipto	19,6

Fonte: Adaptado de Biomass Energy Data Book (http://cta.ornl.gov/bedb).

O processamento anaeróbio da biomassa microalgal ocorre por quatro grupos especializados de bactérias. Primeiramente, as bactérias hidrolíticas clivam os polímeros presentes na biomassa a monossacarídeos. Um segundo grupo de bactérias fermentativas converte os monossacarídeos a ácidos carboxílicos e álcoois, que são então convertidos a acetato, hidrogênio e dióxido de carbono por bactérias acetogênicas. Finalmente, os produtos finais das reações acetogênicas são transformados em metano e dióxido de carbono pelas bactérias metanogênicas. Estes processos de transformação geram como coproduto um biossólido, que pode ser processado adequadamente para incorporação em formulações de biofertilizante. Além disso, o CO_2 formado anaerobicamente pode ser

reciclado e utilizado como fonte de carbono em cultivos fotossintéticos, integrando os processos, conforme visto anteriormente na seção 5.6.

5.6.5. Produção de moléculas bioativas

As microalgas e seus extratos representam uma ampla e inexplorada fonte de compostos com atividade biológica de alto valor agregado. Estes compostos apresentam atividade nutracêutica, antimicrobiana, anti-inflamatória, antienvelhecimento, agregativa e vasoconstritora, hipocolesterolêmica, antioxidante, imunossupressora, fotoprotetora, neurotransmissora entre outras (Raposo *et al.*, 2013). Embora centenas destes metabólitos tenham sido identificados em culturas de micro-organismos fotossintéticos, a indução da síntese é na maioria dos casos desconhecida, a separação e recuperação dos compostos precisa ser otimizada e, desta forma, a inserção na formulação de produtos comerciais dependente ainda de pesquisa e desenvolvimento.

Independente destas limitações, a produção de químicos finos de microalgas consiste na seleção da espécie e definição do cultivo, no isolamento e purificação da molécula alvo e na comprovação da atividade biológica através de testes clínicos e aprovação pelos órgãos responsáveis.

Em nível de classificação química, os compostos com atividade biológica podem ser agrupados em ácidos graxos, esterois, pigmentos, proteínas/enzimas, vitaminas, alcaloides, aminoácidos tipo micosporinas, além de outros compostos não enquadrados nessas classes.

Diversas espécies de microalgas produzem elevadas quantidades de lipídeos, incluindo ácidos graxos essenciais de cadeia longa ω-3 como os ácidos linolênico, eicosapentaenoico (EPA) e docosahexanoico (DHA) e ω-6 como os ácidos linoleico, gama-linolênico (GLA) e araquidônico (ARA). A importância destes compostos está fundamentada na incapacidade de humanos em sintetizar alguns ácidos graxos, razão pela qual estes ácidos são chamados de ácidos graxos essenciais. Estes ácidos graxos, especialmente os ω-3 e ω-6 são determinantes para a integridade dos tecidos onde são incorporados. O GLA encontra aplicações terapêuticas e na formulação de cosméticos por revitalizar a pele e consequentemente retardar o envelhecimento. Os ácidos linoleico e linolênico são nutrientes essenciais para a síntese de prostaglandinas, para o sistema imune e outros processos relacionados com a regeneração de tecidos. O ácido linoleico é também utilizado no tratamento de hiperplasias da pele em formulações tópicas. Os ácidos DHA e EPA estão associados à redução de problemas associados a derrames cardiovasculares, a artrite e hipertensão, além de

apresentarem importante atividade hipolipidêmica, através da redução dos triglicerídeos e aumento do colesterol HDL. O ácido DHA atua ainda no desenvolvimento e funcionamento do sistema nervoso. Os ácidos ARA e EPA apresentam ação agregativa e vasoconstritora de plaquetas e antiagregativa e vasodilatadora no endotélio, além de ação quimiotática nos neutrófilos. A Figura 5.9 demostra representativamente a estrutura de três ácidos graxos poliinsaturados de ocorrência em microalgas.

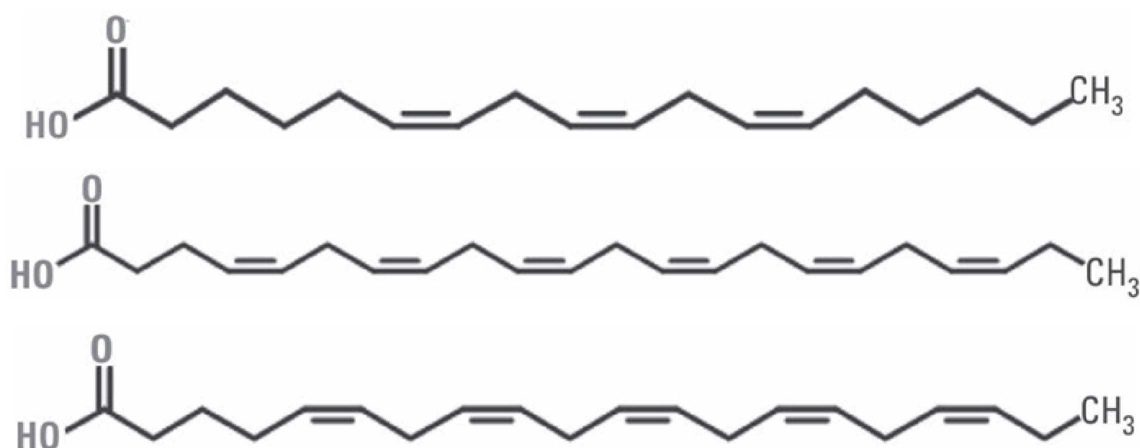


FIGURA 5.9 Ácidos graxos poliinsaturados encontrados em microalgas. *Fonte*: http://www.chemspider.com/.

Em termos de pigmentos, algumas espécies de microalgas podem sintetizar até três classes destes compostos, conforme descrito anteriormente (seção 5.3.1). As cianobactérias em particular sintetizam elevados teores de ficobiliproteínas, com percentuais que alcançam até 8% do seu peso seco. Estes pigmentos têm sido utilizados como marcadores de fluorescência não radioativos quando ligados covalentemente a anticorpos, proteína A, biotina, lecitina e hormônios. Além dessa aplicação, as ficobiliproteínas apresentam importante atividade antioxidante e anti-inflamatória. Em função da estabilidade das moléculas, a ficocianina é usada na formulação de cosméticos como perfumes e maquiagem para os olhos. Os carotenoides são outra importante classe de pigmentos abundantemente encontrados em microalgas. É bem conhecida a atividade pró-vitamina A do β-caroteno e seus efeitos na visão e no sistema imune. Além disso, a atividade antioxidante dos carotenoides está associada à prevenção de câncer, arterioscleroses, doenças degenerativas e envelhecimento (Rodrigues *et al.*, 2015). Em consequência destas propriedades, inúmeros carotenoides têm sido aprovados pelos órgãos

reguladores em diversos países como corantes naturais de alimentos e rações, com destaque especial para a astaxantina produzida pela clorofícea *Haematococcus pluvialis*, que representa a maior fonte natural deste carotenoide. Este pigmento tem sido extensivamente utilizado na alimentação de salmões e trutas como agente colorante. Por fim, devem-se considerar alguns ceto-carotenoides e carotenoides glicosilados exclusivamente encontrados em células microalgais (Rodrigues *et al.*, 2014), como a mixoxantofila, equinenona e cantaxantina (Figura 5.10).

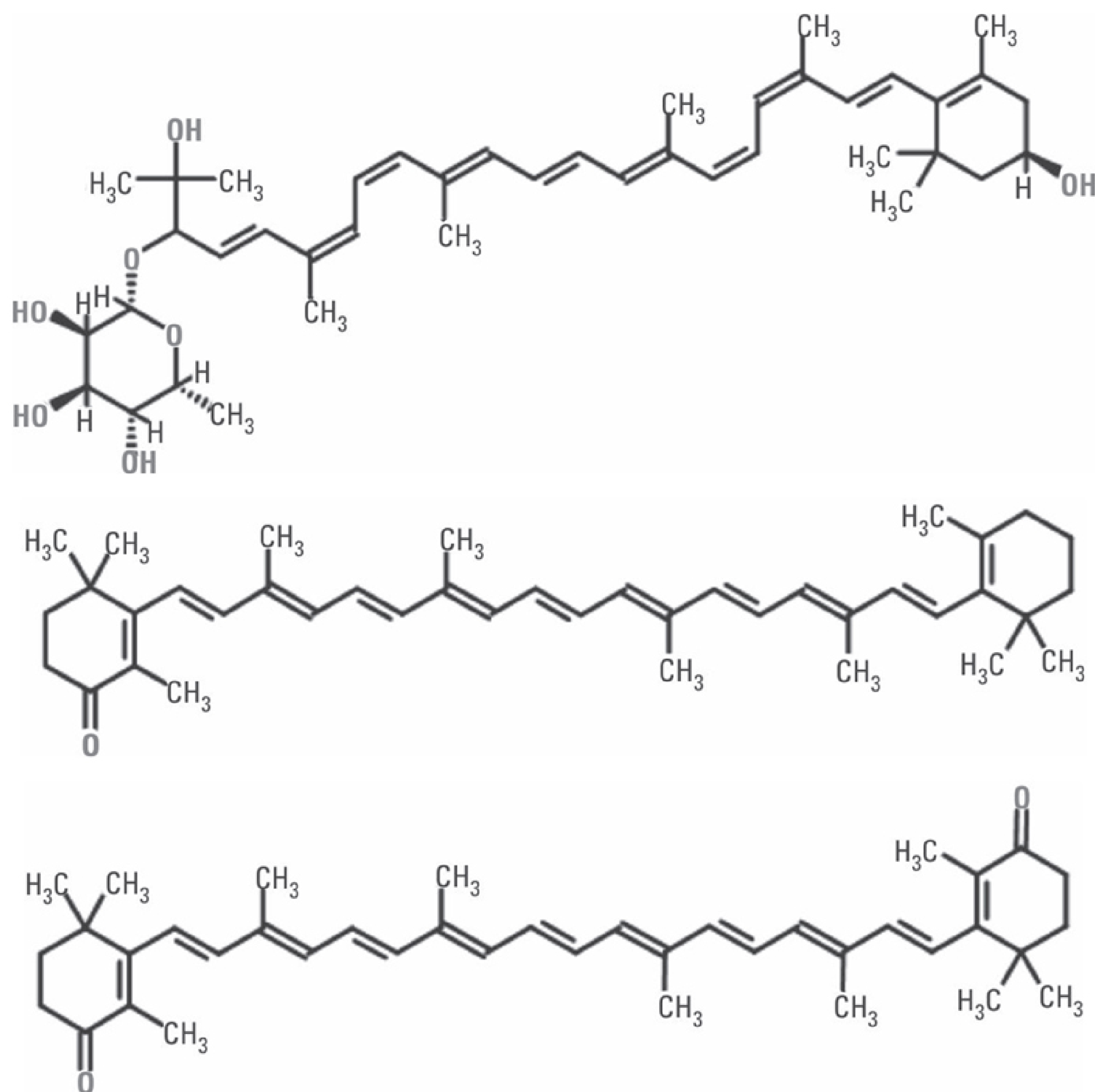


FIGURA 5.10 Carotenoides exclusivos de microalgas. *Fonte*: http://www.chemspider.com/.

Em adição da vitamina A, as células microalgais são ricas em vitamina C, E, tiamina, piridoxina, riboflavina, ácido nicotínico, biotina e tocoferol. Estas estruturas possuem suas aplicações consolidadas em nível de sistema imune, através de atividade antioxidante, formação de células e coagulação do sangue.

Algumas proteínas, peptídeos e aminoácidos apresentam funções biológicas associadas a benefícios nutricionais e à saúde humana. Desta forma, como a maioria das espécies de microalgas apresenta teores acima de 50% de proteína em peso seco, estes biopolímeros podem ser usados como nutracêuticos ou incluídos em formulações de alimentos funcionais. Além das propriedades hipolipidêmica e hipoglicêmica, a ingestão de proteínas unicelulares está associada à redução dos níveis de colesterol e triglicerídeos (Tabela 5.5). Por fim, algumas proteínas de origem microalgal estão associadas à estimulação da produção do hormônio colecistocinina, que regula a supressão do apetite, e portanto têm sido consideradas na formulação de alimentos funcionais contra a obesidade. Em nível de enzimas, algumas metaloenzimas, como a superóxido dismutase, têm sido identificadas em células microalgais, cuja atividade está associada à proteção a danos oxidativos nas células.

Tabela 5.5

Avaliação biométrica, índice glicêmico e colesterol total de ratos *Wistar* alimentados com proteína unicelular (*Aphanothece microscopica Nägeli*) e dieta controle (caseína)

Parâmetro	**Grupo dietético**	
	Caseína	***Aphanothece***
Peso inicial (g)	76,8	76,5
Peso final (g)	145,8	95,8
Ganho de peso (g/dia)	2,46	0,69
Comprimento (cm)	32,4	29,6
Índice glicêmico (mg/dL)	154,0	115,0
Colesterol total (mg/dL)	105,0	83,6

Fonte: Adaptado de Zepka *et al.* (2010).

Além do colesterol, algumas espécies de microalgas produzem esteróis não convencionais como o brassicasterol, campesterol, estigmasterol e silosterol (Figura 5.11). Em função dos elevados teores de esteróis, estas espécies têm sido usadas na formulação de rações para o crescimento de juvenis, especialmente de ostras. Controversamente, embora seja

reconhecido que elevados níveis de colesterol possuem associação com riscos ao sistema cardiovascular, os esteróis provenientes de microalgas marinhas parecem apresentar atividade hipocolesterolêmica em humanos (Bureau of Nutritional Sciences-Health Canada, 2010).

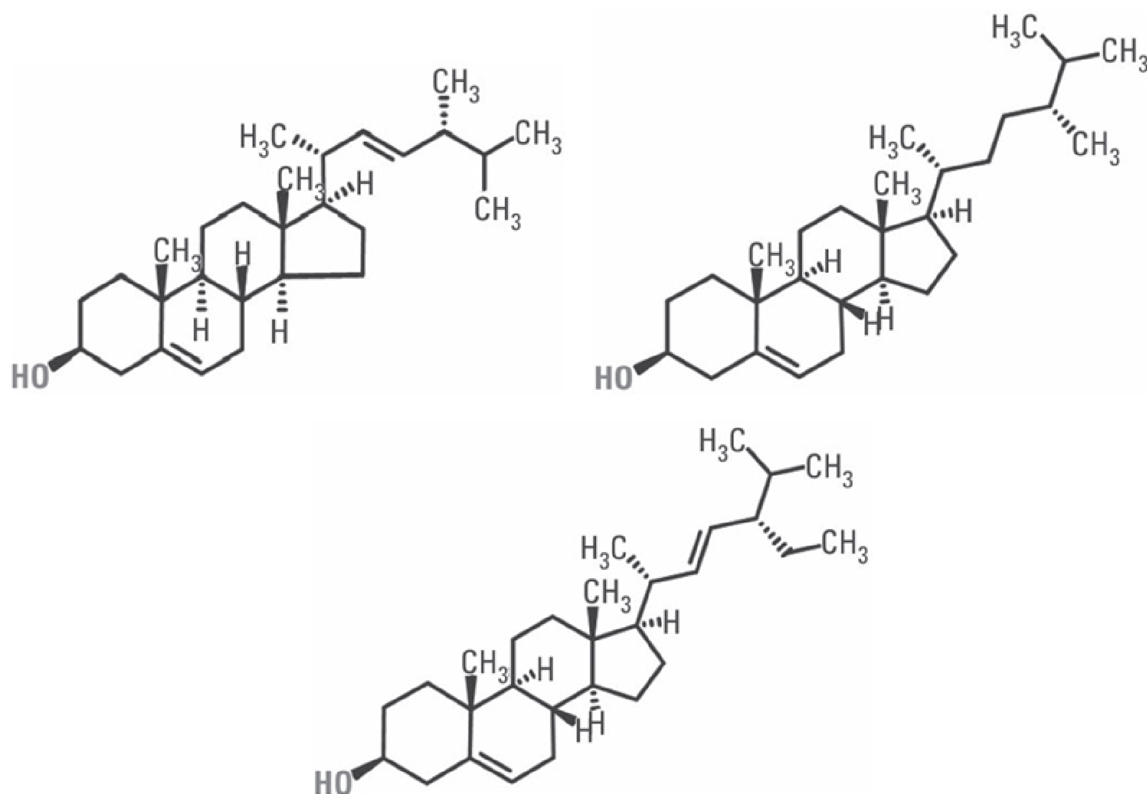


FIGURA 5.11 Esteróis encontrados em microalgas. *Fonte*: http://www.chemspider.com/.

Adicionalmente, compostos bloqueadores solares, derivados de microalgas, têm emergido como uma alternativa às moléculas sintéticas e/ou moléculas de origem botânica. Os compostos com ação fotoprotetora incluem duas classes principais: os aminoácidos tipo micosporinas (MAAs) e a escitonemina (Figura 5.12). Estes compostos apresentam elevada eficiência bloqueadora, fotoestabilidade e baixa toxidade. Os MAAs são compostos derivados de imino-carbonila do cromóforo da ciclohexenona das micosporinas, que possuem um anel substituinte nitrogenado conjugado (um aminoácido ou um aminoálcool). Estes compostos são solúveis em água e apresentam ação contra raios UVB. São encontrados tanto em microalgas eucariotas como procariotas. A

escitonemina é um indol alcaloide, lipossolúvel, encontrado exclusivamente em cianobactérias.

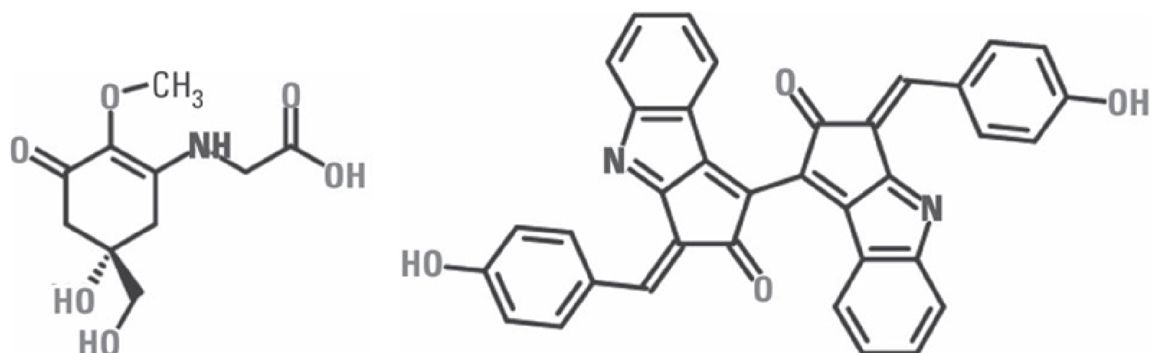


FIGURA 5.12 Moléculas com ação fotoprotetora encontradas em microalgas. *Fonte*: http://www.chemspider.com/.

Não enquadrados em nenhum dos grupos químicos anteriores, compostos como a ciguatoxina, o karatungiol, os ácidos ocadáico, gambiérico e *gama-aminobutírico* têm sido identificados em extratos microalgais (Figura 5.13). Alguns dinoflagelados marinhos, pertencentes à divisão Dinophyta, sintetizam ciguatoxina e ácido ocadáico que apresentam ação antifúngica. O ácido ocadáico tem sido ainda associado à promoção da *secreção* do *fator de crescimento* do *nervo* (NGF). O karatungiol é outra molécula antibiótica produzida por dinoflagelados marinhos com atividade antifúngica e antiprotozoária. Os dinoflagelados marinhos sintetizam ainda o ácido gambiérico, que é um potente antifúngico. Finalmente, o ácido *gama-aminobutírico* é um aminoácido que possui ação estimulante e reguladora do desenvolvimento cerebral. Está associado à excitabilidade neuronal e do tônus muscular.

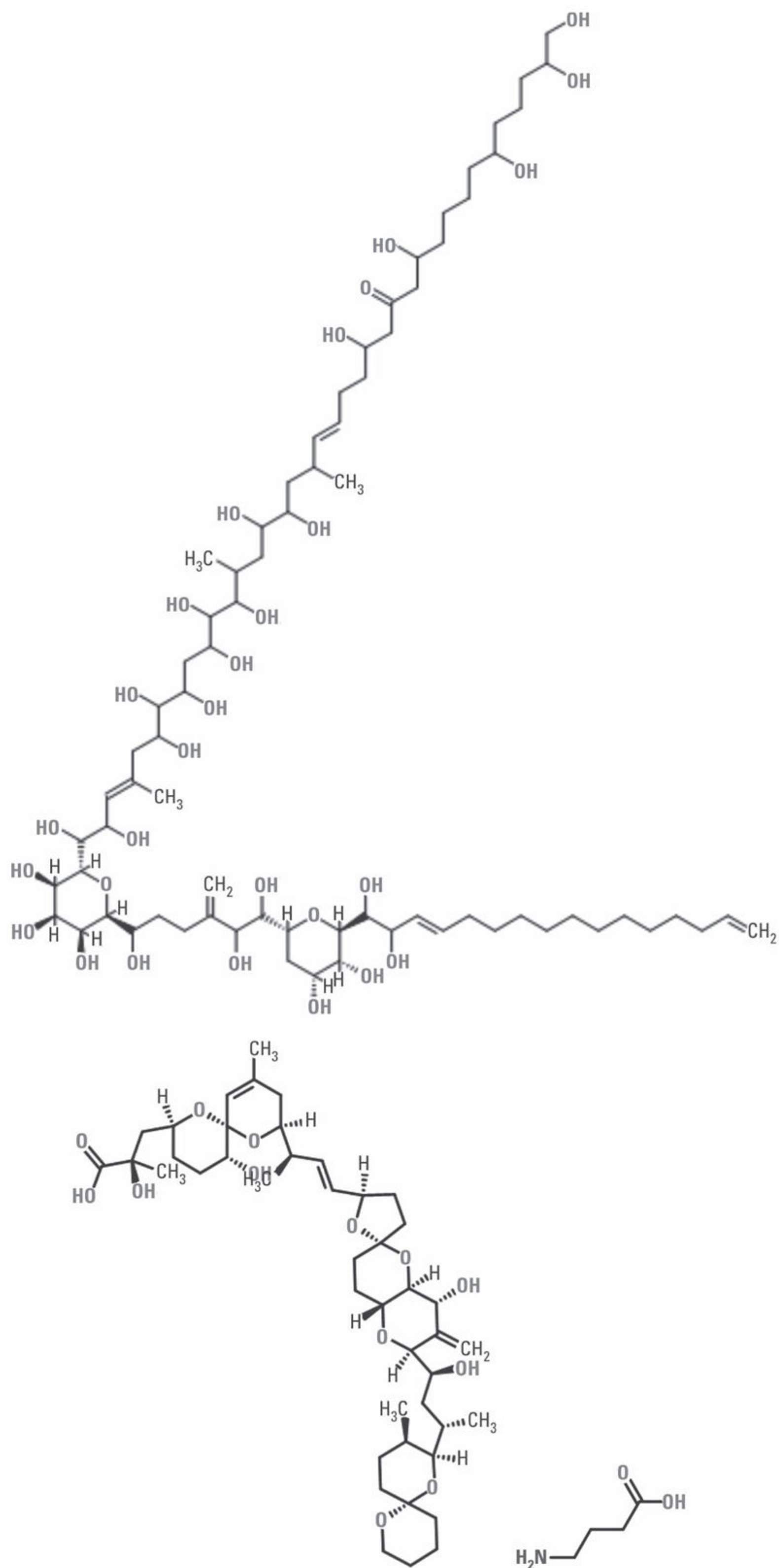


FIGURA 5.13 Compostos bioativos característicos de microalgas. *Fonte*: http://www.chemspider.com/.

5.7. Considerações finais

A diversidade de importantes aplicações de microalgas em inúmeras rotas tecnológicas de produção torna estes micro-organismos biocatalisadores com amplo potencial de exploração agrícola e principalmente industrial. Independente destas potencialidades, a concorrência com rotas tecnológicas consolidadas, baseadas, por exemplo, em insumos fósseis, não renováveis, torna os processos baseados em microalgas, muitas vezes, economicamente inviáveis, no atual cenário.

Desta forma, novas abordagens industriais têm sido propostas e implementadas na direção de viabilizar efetivamente o sucesso técnico-econômico dos processos microalgais. A integração e intensificação de processos associados ao conceito de biorrefino têm sido consideradas as principais estratégias de engenharia que viabilizarão uma ampla exploração comercial de processos baseada em microalgas. Estas novas rotas tecnológicas são orientadas pelo uso efetivo dos recursos industriais, baseados em equipamentos, materiais e técnicas de processamento (Figura 5.14).

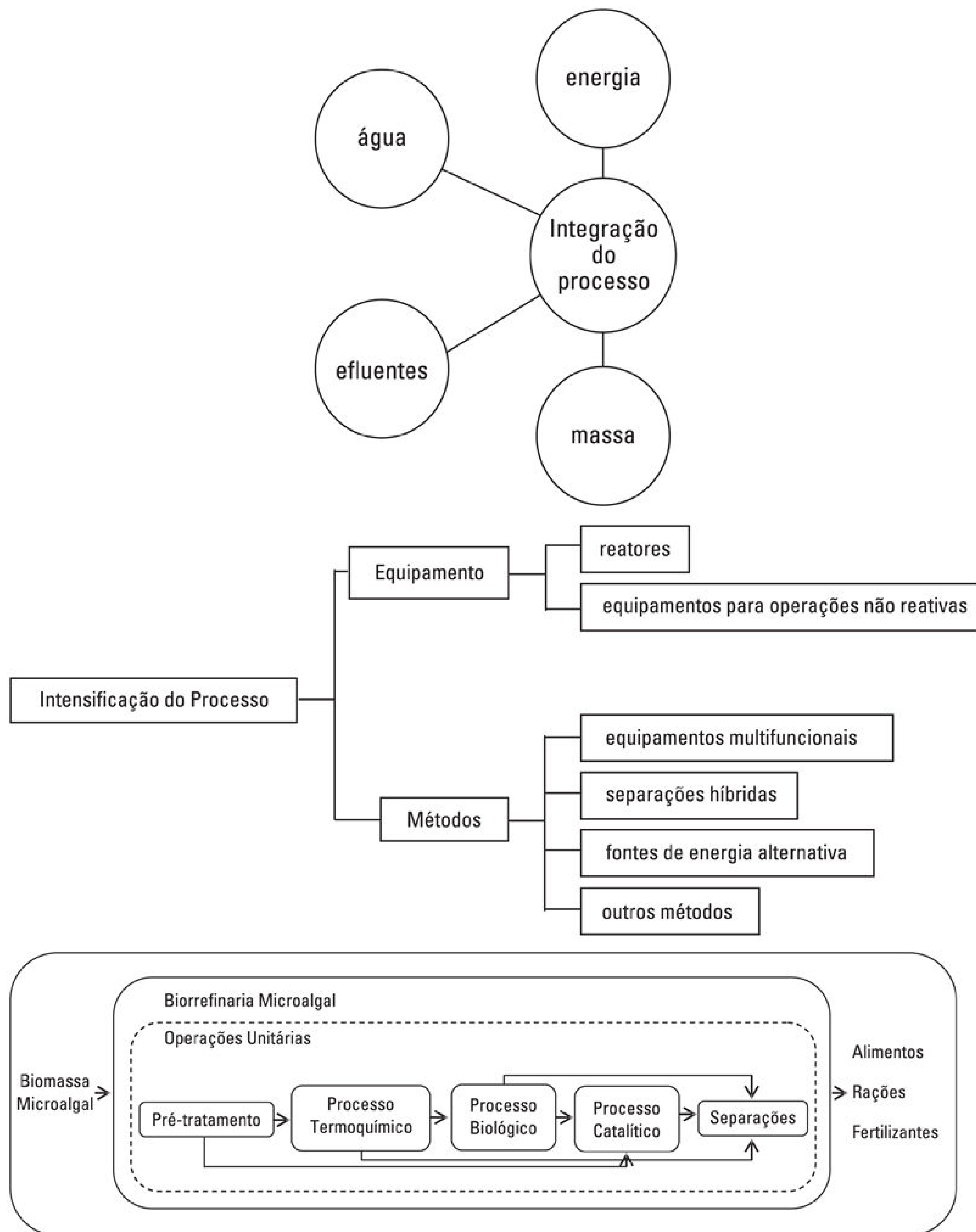


FIGURA 5.14 **Diagrama esquemático de integração e intensificação de processos microalgais e biorrefino da biomassa.**

A integração de processos, através da recuperação e reuso dos excedentes de energia, massa, água e efluentes de processos industriais,

tem sido considerada uma das mais importantes abordagens na direção de viabilizar economicamente os processos baseados em microalgas, principalmente quando o produto final é uma *commodity*, ou seja, produzido em altos volumes e comercializado a baixos preços. Desta forma, o uso de resíduos industriais, principalmente águas residuárias, é uma eficiente maneira de aportar nutrientes (carbono orgânico, nitrogênio e fósforo) às culturas, com paralelo reuso da água (Francisco *et al.*, 2014). Na mesma linha de ação, o uso de dióxido de carbono e óxidos de nitrogênio de fontes estacionárias de emissão dos processos possibilita o aporte de carbono inorgânico e nitrogênio em cultivos fotossintéticos (Jacob-Lopes e Franco, 2013). Ambas as estratégias de integração permitem também a reutilização da energia térmica contida nos resíduos, que pode ser empregada na manutenção da temperatura dos meios de cultura na faixa mesófila. Este tipo de integração é altamente dependente do tipo de resíduo industrial. As agroindústrias, devido às características físico-constitutivas dos resíduos (reduzido nível de compostos tóxicos e compostos inibidores de crescimento microalgal), apresentam maior potencial para a integração.

Em adição, a intensificação de processos se coloca como uma alternativa que possibilita acentuadas melhorias nas plantas de processamento industrial. Está relacionada com o aumento global da eficiência do processo produtivo, através da redução da relação tamanho dos equipamentos/capacidade de produção, consumo de energia e geração de resíduos. Esta evolução poderá resultar na extinção de algumas operações unitárias tradicionais e até mesmo de processos inteiros (Stankiewicz e Moulijn, 2000). Dentro desta abordagem, os processos baseados em microalgas permitem o estabelecimento de reatores multifuncionais aplicáveis ao tratamento de águas residuárias. Convencionalmente, a contenção de poluentes realizada em múltiplas etapas e equipamentos pode reduzir-se a uma etapa única (Jacob-Lopes *et al.*, 2013). Paralelamente, segundo estes autores, reduções no tamanho dos biorreatores e consumo de energia, na ordem de 25%, podem ser alcançadas nesse tipo de processo.

Finalmente, a constituição química da biomassa microalgal permite a exploração de múltiplos produtos, como alimentos, rações, fertilizantes, combustíveis e químicos. A exploração integral deste insumo demanda, no entanto, a abordagem de uma refinaria, em que diferentes operações unitárias de pré-tratamentos, processos termoquímicos, biológicos e catalíticos além de operações de separação são usadas para a obtenção de

produtos e coprodutos, permitindo mais uma vez o uso efetivo dos recursos (Queiroz *et al.*, 2013).

Estas três abordagens de engenharia de processos permitirão em médio prazo a consolidação dos processos baseados em microalgas como efetivos melhoradores da sustentabilidade industrial, equilibrando os vetores: meio ambiente, economia e sociedade.

Revisão dos conceitos apresentados

O termo microalga é desprovido de valor taxonômico, pois inclui seres com grande variabilidade morfofisiológica. Nove grandes grupos fazem parte da classificação geral moderna de microalgas (Cyanophyta, Chlorophyta, Cryptophyta, Chrysophyta, Dinophyta, Euglenophyta, Haptophyta, Prochlorophyta, Rhodophyta).

Metabolicamente, estes micro-organismos são preferencialmente fotossintetizantes, embora algumas espécies usufruam da respiração e fixação de nitrogênio para a manutenção das estruturas celulares, características que ampliam substancialmente o seu potencial biotecnológico.

Os bioprocessos baseados em microalgas podem ser conduzidos em sistemas abertos e fechados. Independente da configuração do biorreator, estas reações requerem o aporte adequado de energia luminosa, característica que diferencia estes processos das principais rotas tecnológicas da biotecnologia industrial. Os cultivos heterotróficos, que operam em completo escuro, são uma exceção a esta regra.

A mediação de rotas metabólicas em paralelo possibilita um amplo potencial de aplicação destes micro-organismos, incluindo aplicações ambientais, produção de alimentos e rações, produção de fertilizantes, produção de bioenergia e produção de moléculas bioativas.

A bioeconomia dos processos e produtos baseados em microalgas enfrenta, no atual estágio de desenvolvimento tecnológico, sérias restrições de viabilidade. No entanto, espera-se que com a aplicação de algumas abordagens de engenharia de processos, que incluem a integração e intensificação de processos associados ao conceito de biorrefino, seja possível, em médio prazo, consolidar comercialmente estas tecnologias.

Questões

1. Discuta os principais aspectos morfofisiológicos e estruturais das microalgas.

2. Relacione os metabolismos fotossintético, respiratório e de fixação de nitrogênio em microalgas, com ênfase na exploração biotecnológica.
3. Atualmente, não existe um consenso a respeito de uma configuração ideal de fotobiorreatores para aplicação industrial. Neste sentido, estabeleça as principais características que aproximariam estes sistemas reativos da idealidade.
4. Com base nos dados da Figura 5.6, estabeleça o impacto do modo de operação nas dinâmicas de consumo de substrato e produção de biomassa em biorreatores heterotróficos microalgais.
5. Compare a exploração das rotas fotossintética e heterotrófica aplicadas ao tratamento de águas residuárias industriais.
6. Determine as características fundamentais que permitem o uso das biomassas microalgais como insumo para produção de alimentos e rações.
7. Analise comparativamente as rotas tecnológicas baseadas em microalgas disponíveis para a fertilização de solos agriculturáveis.
8. Baseado na composição dos óleos microalgais, discuta as principais características que impactam nas propriedades de combustão dos biodieseis de terceira geração.
9. Classifique quanto à bioatividade as moléculas identificadas até o momento em microalgas.
10. Proponha o detalhamento da integração de um processo baseado em microalgas com uma atividade industrial de sua escolha.
11. Esquematize conceitualmente uma biorrefinaria microalgal

Tópico para discussão

1. Discorra sobre a contenção e o gerenciamento de poluentes emergentes presentes em águas residuárias a partir de processos microalgais.

Sugestões para pesquisa

1. Exploração das diferentes rotas metabólicas na produção de bioprodutos de interesse comercial.
2. Modificações e aprimoramento dos processos de produção de microalgas, visando reduzir os custos de produção.
3. Realização de análises de ciclo de vida de diferentes rotas tecnológicas de produção de microalgas.

4. Produção de nutracêuticos e terapêuticos a partir de processos baseados em microalgas.

Referências

American Society for Testing and Materials (ASTM 6751). 2002. Standard Specification for Biodiesel Fuel (B100) Blend Stock for Distillate Fuels. ASTM, West Conshohocken, PA, USA.

Anupama P, Ravindra L. Value-added food: Single cell protein. *Biotechnology Advances*. 2000;18:459–479.

Bicudo CEM, Menezes M. *Gênero de Algas de águas Continentais do Brasil. Chave para identificação e descrição*. 2ª ed São Carlos: Editora Rima; 2006.

Biomass Energy Data Book. Disponível em: http://cta.ornl.gov/bedb. Acesso em agosto de 2015.

Bureau of Nutritional Sciences-Health Canada. Plant sterols and blood cholesterol lowering: summary of Health Canada's Assessment of a Health claim about plant sterols in foods and blood cholesterol lowering. Disponível em: http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/alt_formats/pdf/label-etiquet/claims-reclam/assess-evalu/phytosterols-claim-allegation-eng.pdf. Acesso em agosto de 2015.

Calvin M, Benson AA. The path of carbon in photosynthesis. *Science*. 1948;107:476–480.

Coutinho R. Taxonomia, distribuição, crescimento sazonal, reprodução e biomassa das algas bentônicas no estuário da Lagoa dos Patos (RS). Dissertação de Mestrado. *Fundação Universidade do Rio Grande*. 1982.

Díez B, Ininbergs K. Ecological importance of cyanobacteria. In: Sharma NK, Rai AK, Stal LJ, eds. *Cyanobacteria: An Economic Perspective*. Hoboken: John Wiley; 2013.

European Standard (UNE-EN 14214). 2003. Automotive Fuels – Fatty Acid Methyl Esters (FAME) for Diesel Engine – Requirements and Test Methods. Pilsen, Czech Republic: European Standard.

Falkowski PG, Raven JA. *Aquatic Photosynthesis*. 2nd ed Princeton, NJ: Princeton University Press; 2007: ISBN: 978-0691115511.

FAO/WHO. 1985. Report of ad Hoc Expert Commitee on Energy and Protein Requeriments. Tech Report Series 522.

Fay, P. 1983. The blue-greens (Cyanophyta-Cyanobacteria). First published in Great Britain.

Francisco EC, Balthazar D, Jacob-Lopes E, Franco TT. Microalgae as feedstock for biodiesel production: carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel quality. *Journal of Chemical Technolgy and Biotechnology*. 2010;85:395–403.

Francisco EC, Franco TT, Wagner R, Jacob-Lopes E. Assessment of different carbohydrates as exogenous carbon source in cultivation of cyanobacteria. *Bioprocess and Biosystems Engineering*. 2014;37:1497–1505.

Francisco EC, Franco TT, Zepka LQ, Jacob-Lopes E. *Journal of Environmental Chemical Engineering*. 2015;3:482–487: Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2213343714002851.

Guiry, M.D.; Guiry, G.M. Algae Base: World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Disponível em: http://www.algaebase.org/. Acesso em agosto de 2015.

Jacob-Lopes, E., Santos, A.M., Rodrigues, D.B., Lui, M.C.Y., Souza, C., Prudente, D., Zepka, L.Q. 2013. Bioprocesso de conversão de efluentes híbridos, biorreator heterotrófico, bioprodutos e seus usos. Patente de Aplicação, BRPI10201302047.

Jacob-Lopes E, Franco TT. From oil refinery to microalgal biorefinery. *Journal of CO_2 Utilization*. 2013;2:1–7.

Jacob-Lopes E, Lacerda LMCF, Scoparo CHG, Franco TT. Effect of light cycles (night/day) on CO_2 fixation and biomass production by microalgae in photobioreactors. *Chemical Engineering and Processing*. 2009;48:306–310.

Jacob-Lopes E, Revah S, Hernandez S, Shirai K, Franco TT. Development of operational strategies to remove carbon dioxide in photobioreactors. *Chemical Engineering Journal*. 2009;153:120–126.

Jacob-Lopes E, Santos AB, Fernandes AS, Wagner R, Queiroz MI, Zepka LQ. Biogeneration of volatile compounds from microalgae. In: Taylor A, Mottram D, eds. *Flavour Science*. UK, Leicestershire: Context Products Ltd; 2015.

Jacob-Lopes E, Scoparo CHG, Franco TT. Rates of CO_2 removal by *Aphanothece microscopica Nägeli* in tubular photobioreactors. *Chemical Engineering and Processing*. 2008;47:1365–1373.

Jacob-Lopes E, Scoparo CHG, Queiroz MI, Franco TT. Biotransformations of carbon dioxide in photobioreactors. *Energy Conversion and Management*. 2010;5:894–900.

Jacob-Lopes E, Zepka L, Queiroz MI. Cyanobacteria and Carbon Sequestration. In: Sharma NK, Rai AK, Stal LJ, eds. *Cyanobacteria: An Economic Perspective*. Hoboken: John Wiley; 2013.

Knothe G. Dependence of biodiesel fuel properties on the structure of fatty acid alkyl esters. *Fuel Processing Technology*. 2005;86:1059–1070.

Maroneze MM, Menezes CR, Barin JS, Queiroz MI, Zepka LQ, Jacob-Lopes E. Treatment of cattle-slaughterhouse wastewater and the reuse of sludge for biodiesel production by microalgal heterotrophic bioreactors. *Scientia Agricola*. 2014;71:521–524.

Martínez ME, Sánchez S, Jímenez JM, Yousfis FE, Muñoz L. Nitrogen and phosphorus removal from urban wastewater by the microalga *Scenedesmus obliquus*. *Bioresource Technology*. 2000;73:263–272.

Merchuk JC, Gluz M, Mukmenev I. Comparison of photobioreactors for cultivation of the red microalga *Porphyridium* sp. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2000;75:1119–1126.

Molina Grima E, Fernández FAG, Camacho FG, Chisti Y. Photobioreactors: light regime, mass transfer, and scale up. *Journal of Biotechnology*. 1999;70:231–247.

National Nutrient Database for Standard Reference. Disponível em: http://ndb.nal.usda.gov/. Acesso em agosto de 2015.

National Petroleum Agency (ANP 255). 2003. Provisional Brazilian Biodiesel Standard. ANP, Brasília, DF, Brasil.

Oswald WJ, Gotaas HB. Photosynthesis in sewage treatment. *Transactions of American Society of Civil Engineers*. 1957;122:73–105.

Perez-Garcia O, Escalante FME, de Bashan LE, Bashan Y. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water Research*. 2011;45:11–36.

Prasanna R, Sood A, Ratha SK, Singh PK. Cyanobacteria as a “green” option for sustainable agriculture. In: Sharma NK, Rai AK, Stal LJ, eds. *Cyanobacteria: An Economic*

Perspective. Hoboken: John Wiley; 2013.

Queiroz MI, Jacob-Lopes E, Zepka LQ, Bastos RG, Goldbeck R. The kinetics of the removal of nitrogen and organic matter from parboiled rice effluent by cyanobacteria in a stirred batch reactor. *Bioresource Technology*. 2007;98:2163–2169.

Queiroz MI, Hornes MO, Gonçalves SMA, Jacob-Lopes E. Single-cell oil production by cyanobacterium *Aphanothece microscopica Nägeli* cultivated heterotrophically in fish processing wastewater. *Applied Energy*. 2011;88:3438–3443.

Queiroz MI, Hornes MO, Gonçalves SMA, Zepka LQ, Jacob-Lopes E. Fish processing wastewater as a platform of the microalgal biorefineries. *Biosystems Engineering*. 2013;115:195–202.

Queiroz MI, Koetz PR. Caracterização do efluente da parboilização do arroz. *Revista Brasileira de Agrociência*. 1998;1(4):139–142.

Queiroz MI, Zepka LQ, Bastos R. Evaluation of single-cell protein production by *Aphanothece microscopica Nägeli* in batch reactor. *Food Science and Biotechnology*. 2004;13:215–220.

Ramírez-Mérida LG, Zepka LQ, Jacob-Lopes E. Why does the Photobioreactors Fail? *Journal of Bioprocessing & Biotechniques*. 2015;5:7–17.

Raposo MFJ, Morais RMSC, Morais AMMB. Health applications of bioactive compounds from marine microalgae. *Life Sciences*. 2013;93:479–486.

Richmond A. Spirulina. In: Borowitzka MA, Borowitzka LJ, eds. *Micro-Algal Biotechnology,*. Reino Unido: Cambridge University Press; 1988.

Rodrigues DB, Flores EMM, Barin JS, Mercadante AZ, Jacob-Lopes E, Zepka LQ. From waste to natural pigments: productions of microalgal carotenoids in agroindustrial wastewater. *Food Research International*. 2014;65:144–148.

Rodrigues, D.B., Mercadante, A.Z., Menezes, C.R., Jacob-Lopes, E., Zepka, L.Q. 2015. Bioactive pigments from microalgae *Phormidium autumnale*. Food Research International. In press.

Royal Society of Chemistry. ChemSpider. Disponível em: http://www.chemspider.com/. Acesso em agosto de 2015.

Santos, A.M. 2013. Biorrefinarias Agroindustriais. Dissertação de Mestrado. Santa Maria, RS: Universidade Federal de Santa Maria.

Siqueira, S.F., Francisco, E.C., Queiroz, M.I., Zepka L.Q., Jacob-Lopes, E. 2015. Third generation biodiesel production from microalgae *Phormidium autumnale*. Brazilian Journal of Chemical Engineering. In press.

Slegers PM, Lösing MB, Wijffels RH, van Straten G, van Boxtel AJB. Scenario evaluation of open pond microalgae production. *Algal Research*. 2013;2:358–368.

Slegers PM, Wijffels RH, van Straten G, van Boxtel AJB. Design scenarios for flat panel photobioreactors. *Applied Energy*. 2011;88:3342–3353.

Slegers PM, Wijffels RH, van Straten G, van Boxtel AJB. Scenario analysis of large scale algae production in tubular photobioreactors. *Applied Energy*. 2013;105:395–406.

Smith AJ. Modes of cyanobacterial carbon metabolism. In: Carr NG, Whitton BA, eds. *The Biology of Cyanobacteria*. University of California Press; 1982.

Stankiewicz A, Moulijn JA. Process intensification: transforming chemical engineering. *Chemical Engineering Progress*. 2000;96:22–34.

Tam NFY, Wong YS. Effect of immobilized microalgal bead concentrations on wastewater nutrient removal. *Environmental Pollution*. 2000;107:145–151.

Van den Hoek C, Mann DG, Jahns HM. *Algae – An Introduction to Phycology*. New York: Press Sindicate of the University of Cambridge; 1995.

Vieira JG, Manetti AGS, Jacob-Lopes E, Queiroz MI. Uptake of phosphorus from dairy wastewater by heterotrophic cultures of cyanobacteria. *Desalination and Water Treatment*. 2012;40:1–3.

Zepka LQ, Jacob-Lopes E, Goldbeck R, Queiroz MI. Production and biochemical profile of the microalgae *Aphanothece microscopica Nägeli* submitted to different drying conditions. *Chemical Engineering and Processing*. 2008;47:1305–1310.

Zepka LQ, Jacob-Lopes E, Souza-Soares LA, Queiroz MI. Nutritional evaluation of single-cell protein produced by *Aphanothece microscopica Nägeli*. *Bioresource Technology*. 2010;101:7118–7122.

CAPÍTULO 6

Engenharia Genética Aplicada à Microbiologia

Wendel Batista da Silveira

Raphael Hermano Santos Diniz

Tatiana Maria de Souza-Moreira

Denise Mara Soares Bazzolli

Conceitos apresentados neste capítulo

Inicialmente, uma introdução à biologia molecular será apresentada no intuito de revisar a estrutura e função dos ácidos nucleicos, bem como as técnicas moleculares importantes para a manipulação deles. Além disso, os princípios básicos da regulação da expressão gênica serão abordados à luz da engenharia genética. Em seguida, serão apresentados os conceitos de mutação, os tipos de mutação e mutantes. A obtenção de organismos geneticamente modificados será apresentada utilizando exemplos de mutagênese e engenharia genética. No tocante à engenharia genética, atenção especial será dada à superexpressão de genes e à expressão heteróloga de proteínas. Por fim, os aspectos de biossegurança relacionados com a obtenção de organismos geneticamente modificados serão apresentados de acordo com a legislação vigente no Brasil.

6.1. Introdução

Os micro-organismos vêm sendo utilizados industrialmente para a produção de bebidas, alimentos, biocombustíveis, enzimas, proteínas recombinantes, vacinas, hormônios, biopolímeros e antibióticos, ocupando, assim, um papel de destaque na biotecnologia (Tabela 6.1). Os micro-organismos utilizados em processos industriais são comumente modificados geneticamente visando o aumento da produtividade dos metabólitos de interesse. Inicialmente, os micro-organismos usados na indústria foram melhorados por mutagênese com o uso de agentes físicos e químicos, de maneira empírica, seguida da seleção dos mutantes com as características de interesse. No entanto, a obtenção desses mutantes é laboriosa, tornando difícil a triagem e identificação dos genes mutados. Com o estabelecimento da engenharia genética, que é o conjunto de técnicas moleculares que permitem manipular os ácidos nucleicos, a obtenção de organismos geneticamente modificados pode ser realizada de forma direcionada. Atualmente, pode-se introduzir mutações *in vitro* no gene que codifica uma enzima de importância industrial de maneira mais rápida e racional. Além disso, genes heterólogos, isto é, de outros organismos, podem ser introduzidos em células microbianas para que elas produzam proteínas ou metabólitos de interesse. Portanto, a engenharia genética contribuiu e continua a melhorar substancialmente os bioprocessos, bem como atua na ampliação de uma gama de produtos produzidos originalmente por micro-organismos.

Tabela 6.1

Produtos biotecnologicamente obtidos a partir de diferentes micro-organismos

Proteínas	**Micro-organismos**
Penicilina G acilase	*Bacillus* spp., *Pseudomonas aeruginosa*
β-lactamase	*Halomonas elongata*
Celulases	*Brevibacterium lactofermentum* e *Bacillus* spp.
α-Amilases	*Bacillus* spp.
Lipases	*Bacillus* spp., *Aspergillus oryzae*, *Pichia pastoris*
Diferentes antígenos, interferons, fatores de crescimento, vacinas e receptores, entre outros fármacos	*Bacillus* spp., *P. pastoris* e *Saccharomyces cerevisiae*
Moléculas pequenas	**Micro-organismos**
Biocombustíveis: etanol, butanol, farneseno (para produção de biodiesel)	*S. cerevisiae*
Ácido lático para a produção de polímeros	*Bacillus* spp., *Escherichia coli*, *Lactobacillus* spp., *Rhizopus oryzae* e *S. cerevisiae*
Ácido succínico para a produção de polímeros	*Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *E. coli* e *S. cerevisiae*
Aminoácidos	*Corynebacterium* spp.
Vitamina B2 (riboflavina)	*Bacillus subtilis*
Compostos terapêuticos como amorfadieno, precursor do antimalárico artemisinina e resveratrol, um antioxidante	*S. cerevisiae*
Compostos aromáticos, como vanilina e santaleno	*S. cerevisiae*
Pigmentos	*Monascus purpureus*, *Phaffia rhodozyma*

6.2. Introdução à biologia molecular

O dogma central da biologia molecular situa-se no fato de que uma sequência gênica, que é herdada pelo processo de replicação, é transcrita em uma mensagem que será, então, traduzida em uma dada proteína cuja função é requerida pela célula. Portanto, a biologia molecular é caracterizada pelo estudo da estrutura e função dos ácidos nucleicos, constituindo a base para a aplicação da engenharia genética. Nesse contexto, suas bases serão descritas a seguir.

6.2.1. Estrutura do ácido desoxirribonucleico (DNA)

O DNA é um polímero altamente estável composto por monômeros chamados de desoxirribonucleotídeos que, por sua vez, são formados por três componentes: (i) um grupo fosfato; (ii) uma pentose (desoxirribose); e (iii) uma base nitrogenada. O DNA é formado por duas cadeias de polidesoxirribonucleotídeos, mantidas juntas pelo pareamento de bases, que se espiralam ao redor de um eixo imaginário. As duas cadeias principais de açúcar-fosfato possuem direção 5′→3′ sendo que estas se ligam uma oposta à outra, ou seja, uma está no sentido 5′→3′ e outra no 3′→5′, apresentando, assim, uma organização antiparalela. Este arranjo propicia que as bases nitrogenadas estejam dispostas na região interna do eixo imaginário e os grupos fosfatos voltados para fora da molécula. As bases nitrogenadas são subdivididas em dois grupos: pirimidinas e purinas. Fazem parte das pirimidinas, timina (T), citosina (C) e uracila (U – presente apenas na molécula de RNA), enquanto que as purinas são formadas pela adenina (A) e guanina (G) (Figura 6.1).

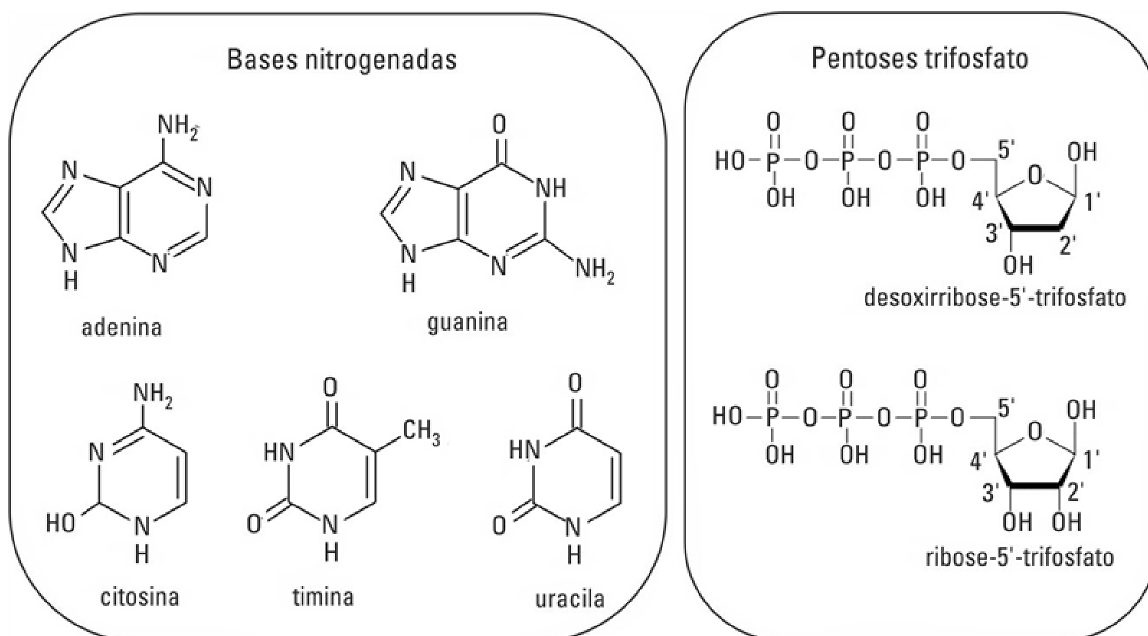


FIGURA 6.1 **Componentes dos ácidos nucleicos: bases nitrogenadas, pentoses e fosfatos.**

Cada base nitrogenada se liga à sua complementar formando pares específicos. Timina se liga apenas à adenina através de duas ligações de hidrogênio (A = T), enquanto que citosina se liga à guanina a partir de três ligações de hidrogênio (C = G) e vice-versa (T = A e G = C). Deste modo, as duas fitas da molécula de DNA são complementares entre si, constituindo uma estrutura secundária, de giro mão direita, estrutura proposta por Watson e Crick em 1953. A compactação do DNA ocorre por superespiralamento (dobramento da molécula de DNA sobre si mesma), na maioria das vezes, negativo (Domínios Eukarya e Bacteria) e positivo (alguns organismos do domínio Archaea).

6.2.2. Replicação

A molécula de dupla fita de DNA pode se duplicar por um processo denominado de replicação, um processo com alta fidelidade e que permite que as células-filhas, após a divisão celular, possam receber toda a informação genética imprescindível à manutenção da vida. Tal processo garante que a informação genética dos organismos seja conservada. Durante a replicação, as fitas de DNA são separadas e cada fita é utilizada como molde para a síntese de uma nova molécula. Devido à característica complementar do DNA, apenas os nucleotídeos com o pareamento específico serão ligados às fitas-molde formando assim, novas fitas chamadas de fitas-filhas. Por exemplo, se uma fita-molde possui os

nucleotídeos 5′-ATGCAATC-3′ a fita- filha apresentará a sequência 3′-TACGTTAG-5′, deste modo, diz-se que a replicação do DNA é semiconservativa, uma vez que a cada nova molécula de DNA formada, sempre haverá 50% da molécula anterior (fita-molde).

A replicação do DNA é um evento complexo que envolve diversas proteínas e enzimas, sendo que a síntese da nova fita de DNA é catalisada por enzimas denominadas DNA polimerases, que requerem inicialmente a adição de um oligonucleotídeo iniciador, também chamado de *primer* (Figura 6.2). Essa enzima catalisa a adição de um desoxirribonucleotídeo na extremidade 3′-OH livre da desoxirribose, presente no último desoxirribonucleotídeo do *primer* pareado à fita-molde. Portanto, a DNA polimerase catalisa uma ligação fosfodiéster no sentido 5′→3′ e depende da junção *primer*-DNA fita-molde para catalisar o alongamento da nova molécula de DNA. A replicação do DNA começa em uma região denominada origem de replicação e neste ponto a replicação ocorre nas duas direções do DNA. As enzimas DNA polimerases apenas podem elongar a nova molécula no sentido 5′→3′, isto significa que apenas a molécula de DNA-molde que apresenta o sentido 3→5′ pode ser sintetizada continuamente. A fita-molde que apresenta o sentido 5′→3′, é sintetizada de forma semidescontínua formando pequenos fragmentos de DNA descontínuos chamados de fragmentos de Okazaki (Figura 6.2). Cada complexo de proteínas envolvidas na replicação do DNA a partir da origem de replicação é denominado forquilha de replicação. Portanto, a replicação é um processo bidirecional, semiconservativo e semidescontínuo.

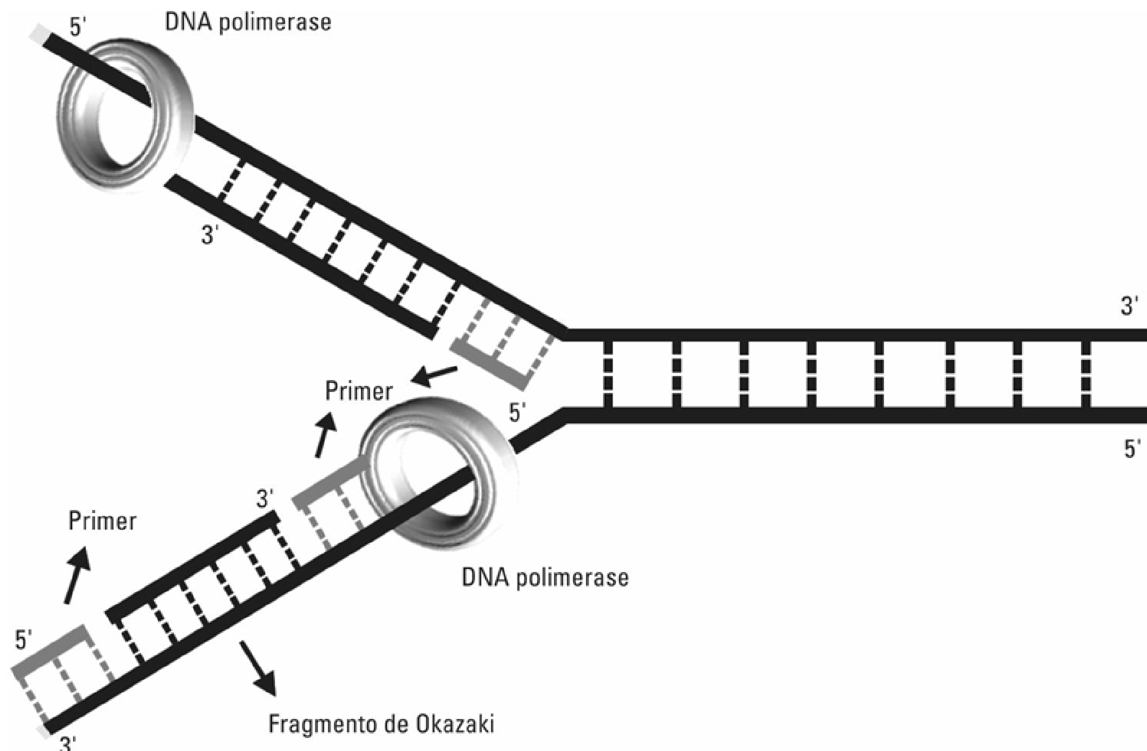


FIGURA 6.2 Esquema geral do processo de replicação do DNA gerando duas fitas- -filhas, visualizado a partir de um dos lados da origem de replicação.

6.2.3. Expressão gênica

Na expressão gênica, o processo de transcrição tem como produto a mensagem codificadora na forma, geralmente, de moléculas de RNA mensageiro (mRNA) e esta é traduzida, então, em aminoácidos no processo de tradução, formando uma proteína.

O mRNA é sintetizado como uma fita simples de ribonucleotídeos, ou seja, a pentose ligada às bases nucleotídicas é uma ribose que possui uma hidroxila na posição 2′ do açúcar. As bases A, G e C também são utilizadas na polimerização do mRNA, contudo, a RNA polimerase adiciona a base nitrogenada uracila (U) (Figura 6.1) em complementação à adenina, em oposição ao processo de replicação, em que uma timina (T) é pareada à referida base.

No processo de expressão de um gene, a molécula de mRNA é sintetizada, a partir do DNA, pela atividade da enzima RNA polimerase após a interação com sequências específicas, situadas comumente a 10 e a 35 nucleotídeos em procariotos antes do primeiro nucleotídeo a ser transcrito (e, por isso, são diferenciados com um sinal -, assim, são

sequências situadas a -10 e -35 nucleotídeos) e a -25 nucleotídeos em eucariotos. As sequências a -10 em procariotos e a -25 em eucariotos possuem um consenso (região conservada no DNA, ou seja, presente na maioria dos organismos vivos com poucas alterações) de timinas (T) e adeninas (A) e são conhecidas como TATA *box*. A região que abrange as sequências de ligação da RNA polimerase é chamada de região promotora ou, simplesmente, promotor e a ligação da enzima a estas sequências específicas propicia o início da síntese do mRNA, determinando qual das duas fitas de DNA servirá de molde para a transcrição (Figura 6.3).

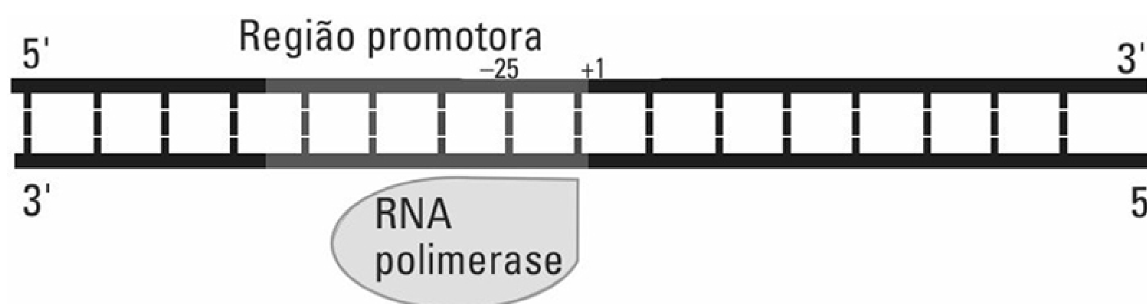


FIGURA 6.3 Enzima RNA polimerase ligada à região promotora.

A enzima se desloca então ao longo da fita de DNA molde adicionando os nucleotídeos no sentido 5′→3′ por meio de ligações fosfodiéster. Ao terminar a transcrição, a polimerase de procariotos desprende-se do DNA e libera o mRNA após adicionar uma sequência de resíduos de uracila que, por serem complementares entre si, formam uma estrutura de grampo. Em alguns casos, o término da transcrição também pode ocorrer pela ação do fator Rho (ϱ) - proteína envolvida no término da transcrição em procariotos. Em eucariotos, a molécula de mRNA irá se desprender após a síntese da sequência que sinaliza sua clivagem e, imediatamente, uma outra polimerase irá promover a adição de 100 a 200 resíduos de adenina, formando uma cauda de poli-adeninas (poli-A).

Outros processos também diferenciam o mRNA de procariotos e de eucariotos, como, por exemplo, a adição, logo após o início da transcrição, de um capacete de guanidina. Esta estrutura é formada pela ligação trifosfato entre o carbono 5′ de um resíduo de 7-metil-guanosina ao primeiro nucleotídeo do mRNA eucariótico. O *splicing* é outro processo característico presente em eucariotos que consiste na retirada de íntrons, que são sequências não codificadoras do mRNA. Este processo ocorre antes do transporte mRNA do núcleo para o citoplasma.

Em procariotos, a tradução é iniciada antes mesmo do final da transcrição (Figura 6.4A.). Desta forma, a resposta metabólica de procariotos acaba sendo mais rápida e a meia-vida do mRNA mais curta quando comparado aos eucariotos. Por outro lado, em eucariotos, a tradução se inicia apenas após o transporte do mRNA para o citoplasma e do reconhecimento do cap 5' (capacete) pela maquinaria de tradução, contribuindo para que a resposta a variações ambientais seja relativamente mais demorada do que em procariotos (Figura 6.4B). A estabilidade do mRNA eucariótico, por sua vez, também está relacionada com a presença do capacete de guanidina e da cauda poli-A.

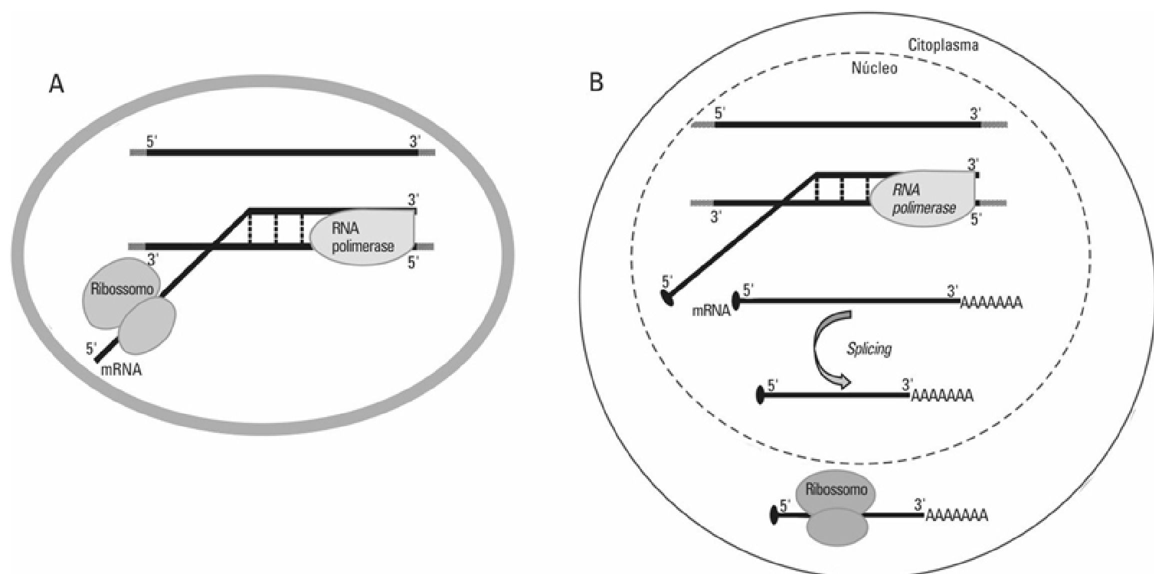


FIGURA 6.4 **Esquema mostrando as principais diferenças no processo de transcrição entre procariotos (A) e eucariotos (B).**

6.2.4. Regulação da expressão gênica

O início da transcrição é um processo crucial na regulação da expressão gênica e, portanto, a região promotora tem um papel fundamental neste processo devido à eficiência com que a RNA polimerase se liga à sequências específicas. Tais sequências apresentam um consenso de nucleotídeos, mas ainda assim existe uma variação considerável que influencia a afinidade da polimerase e, consequentemente, o início da transcrição.

Além das sequências gênicas reconhecidas pela RNA polimerase e pelo seus respectivos fatores basais e outros fatores de transcrição específicos

que também interferem na eficiência da ligação da RNA polimerase ao DNA e, por consequência, na eficiência da transcrição. Em bactérias, existe apenas uma única RNA polimerase, e esta é composta por cinco subunidades (?1, α2, α', β′ e′β α2 β β′ ω), e um fator específico, denominado de fator δ, responsável pela especificidade e ligação a promotores distintos. Já em eucariotos, existem pelo menos três RNA polimerases nucleares e ainda as encontradas nas mitocôndrias e/ou cloroplastos, e o número de subunidades presentes em cada uma delas depende do organismo. No entanto, para serem competentes na transcrição as RNA polimerases dependem de inúmeros fatores de transcrição, que podem ser divididos em gerais e específicos e estão envolvidos no reconhecimento e na ligação da RNA polimerase à região promotora e na ativação do complexo de início da transcrição.

Alguns genes são transcritos de forma constante, ou seja, sua expressão é constitutiva e, geralmente, estão envolvidos com processos centrais de manutenção celular. Para estes genes, a eficiência da interação entre a RNA polimerase e o promotor é o evento predominante para sua transcrição. Contudo, a expressão de outros genes precisa ser regulada, principalmente em resposta a sinais moleculares. Pode-se dizer que a expressão de alguns genes, em determinados momentos, precisa ser ligada e, em outros, desligada. Proteínas regulatórias assumem este papel de induzir (ativadores) e/ou de reprimir (repressores) a transcrição de tais genes, interagindo na ligação dos fatores de transcrição e da RNA polimerase ao DNA.

Em procariotos, a ligação das proteínas regulatórias ocorre geralmente em regiões próximas ao início da transcrição. Proteínas repressoras se ligam a uma região do promotor denominada operador e dificultam o início da transcrição. Proteínas ativadoras, por sua vez, se ligam de forma a facilitar a interação da RNA polimerase e a propiciar o início da transcrição. Contudo, existem ainda proteínas regulatórias que se ligam a regiões distantes, mas interferem com a interação RNA polimerase-promotor por meio de um complexo que facilita uma certa remodelagem da hélice do DNA, processo que é mais comum em eucariotos. Em leveduras, uma sequência adicional de regulação da transcrição é chamada de sequência ativadora *upstream* (ou *upstream activator sequence*, UAS) e está localizada há aproximadamente cem nucleotídeos do ponto +1 da transcrição.

O processo de regulação negativa é mais comum em procariotos. A interação do repressor com o operador, próxima à região promotora, inibe o início da transcrição por impedir a ligação da polimerase ao DNA ou o

seu movimento ao longo deste (Figuras 6.5A e 6.5B). Já o oposto ocorre no processo de regulação positiva, em que o ativador promove com maior eficiência a ligação da RNA polimerase ao DNA (Figuras 6.5C e 6.5D). Comumente, a ação de um repressor ou um ativador está relacionada com a ligação de uma molécula sinal efetora. A ligação entre a molécula efetora e a proteína reguladora leva à alteração da conformação da segunda promovendo ou inibindo a interação desta com o DNA. Em eucariotos, a regulação positiva é mais frequente que a negativa visto que o enovelamento do DNA por si já dificulta a interação do complexo de transcrição, servindo como um controle negativo.

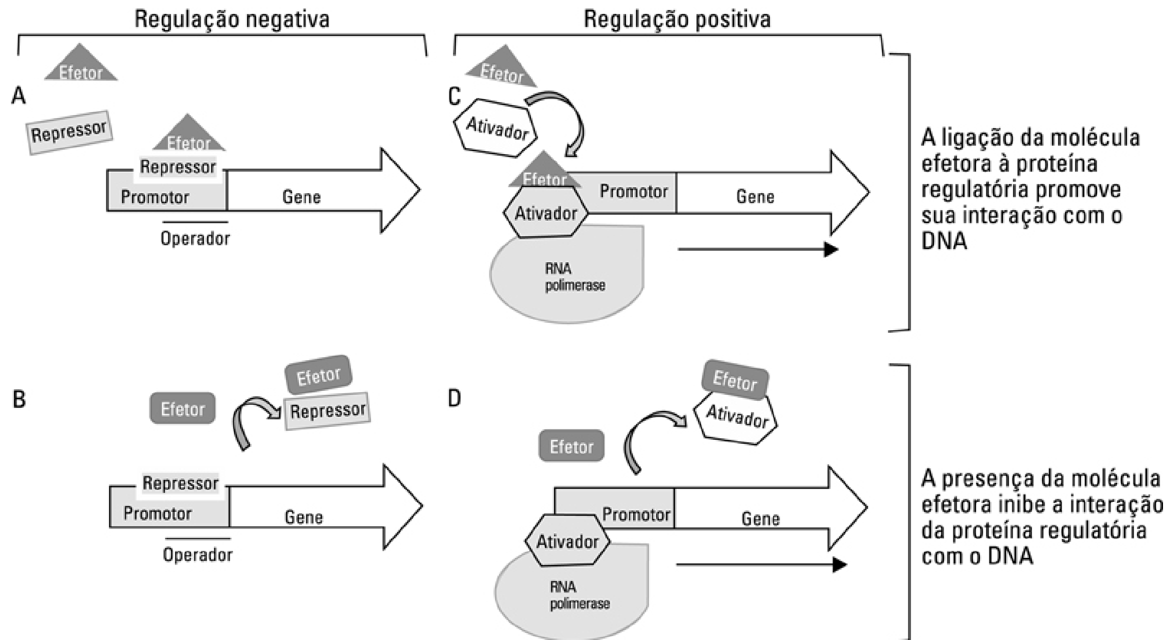


FIGURA 6.5 Representação da regulação negativa e positiva. A presença da molécula sinal efetora e sua interação com a proteína regulatória pode levar à promoção da interação com o DNA ou à sua inibição. A regulação negativa inibe o início da transcrição: (A) a ligação do efetor à proteína regulatória promove a interação do repressor ao DNA reprimindo a transcrição; (B) a proteína repressora interagindo com o DNA inibe a transcrição, mas sua remoção pela alteração promovida pela ligação à molécula efetora promove o processo. Na regulação positiva, o início da transcrição é promovido: (C) a ligação da molécula efetora à proteína regulatória ativa sua interação com o DNA e promove a transcrição; (D) a interação da proteína ativadora com o DNA promove a transcrição do gene, mas a atividade desta proteína é inibida pela ligação do efetor ao ativador.

Procariotos ainda apresentam uma forma de regulação que coordena a transcrição de mais de um gene relacionado funcionalmente a um processo. Um operon é um conjunto de genes (maior ou igual a dois genes) regulados pela mesma região reguladora e terminadora. Assim, a RNA polimerase, ao se ligar a este promotor, promove a transcrição de todos os genes que seguem em um só transcrito, chamado de mRNA policistrônico. Posteriormente, estes genes serão traduzidos em diferentes proteínas, uma vez que no mRNA policistrônico, o sítio específico para ligação do ribossomo (sequência Shine-Dalgarno) existe antes do codon iniciador da tradução de cada gene. A regulação de um operon, portanto,

promove a ativação ou inibição de várias proteínas relacionadas, o que leva a uma resposta celular eficiente em reconhecimento a um sinal.

Além da regulação da expressão gênica, outros processos podem ser controlados para o correto balanço do nível de uma determinada proteína. No processo de transcrição, não necessariamente uma proteína regulatória interfere na síntese do mRNA, mas também na conformação que o próprio mRNA assume na presença de um sinal molecular (como na regulação da biossíntese de triptofano e de purinas). Em eucariotos, o processamento do mRNA na sua forma madura é alvo de controle na poliadenilação, no "splicing", no transporte do mRNA para fora do núcleo, na seleção de quais mRNAs serão traduzidos e quais serão degradados e no controle da atividade proteica. O controle proteico pode ocorrer por meio da interferência em sua ativação e no correto dobramento e localização de proteínas que, neste caso, pode interferir em sua degradação. Entretanto, a regulação do início da transcrição é o ponto de controle que evita gastos energéticos relacionados com os processos de transcrição, processamento, transporte e tradução.

6.2.5. Repressão e indução catabólica

A adaptação celular à fonte de carbono é uma das condições mais importantes em que ocorre regulação da expressão gênica. Para a maioria das células, a glicose é a fonte de carbono preferencial e, em consequência, a célula reprime a transcrição e tradução de enzimas envolvidas nas vias de utilização de outras fontes de carbono, sendo este fenômeno conhecido como repressão catabólica. Contudo, quando a glicose não está presente no meio o catabolismo de outras fontes de carbono é induzido.

Em *Escherichia coli*, a expressão dos genes codificados pelo operon da lactose permite o uso desta fonte de carbono quando a glicose está ausente (Figura 6.6). Fazem parte do operon, os genes que codificam as proteínas β-galactosidase (*lacZ*), galactose permease (*lacY*) e tiogalactose transacetilase (*lacA*). Na presença de glicose, independente da presença ou não de lactose, a expressão do operon *lac* é muito baixa porque a proteína ativadora de catabolismo (em inglês, CAP) não se liga ao seu sítio localizado próximo ao promotor do operon (Figura 6.6). Isso ocorre porque o nível de seu coativador AMP cíclico é muito baixo. Soma-se a isso, a repressão exercida pelo repressor *lac* (codificado pelo gene *lacI*, codificado fora do operon), que na ausência de lactose mantém-se ligado ao operador do operon, inibindo sua transcrição. Por outro lado, quando a glicose está ausente e há lactose no meio como fonte de carbono e energia:

(i) os níveis de AMP cíclico intracelular aumentam, promovendo a ligação da proteína ativadora ao seu sítio e (ii) as poucas moléculas de lactose que entram na célula devido à baixa transcrição dos genes do operon são isomerizadas a alolactose, e (iii) ligam-se ao repressor gerando uma mudança conformacional que permite que o mesmo se desligue do operador (Figura 6.6). Estes eventos permitem que a transcrição dos genes do operon aumente consideravelmente e que a célula passe a utilizar a nova fonte de carbono. O que se observa, portanto, é que a célula ativa a transcrição dos genes do operon *lac* quando duas condições são atendidas: ausência de glicose e presença de lactose.

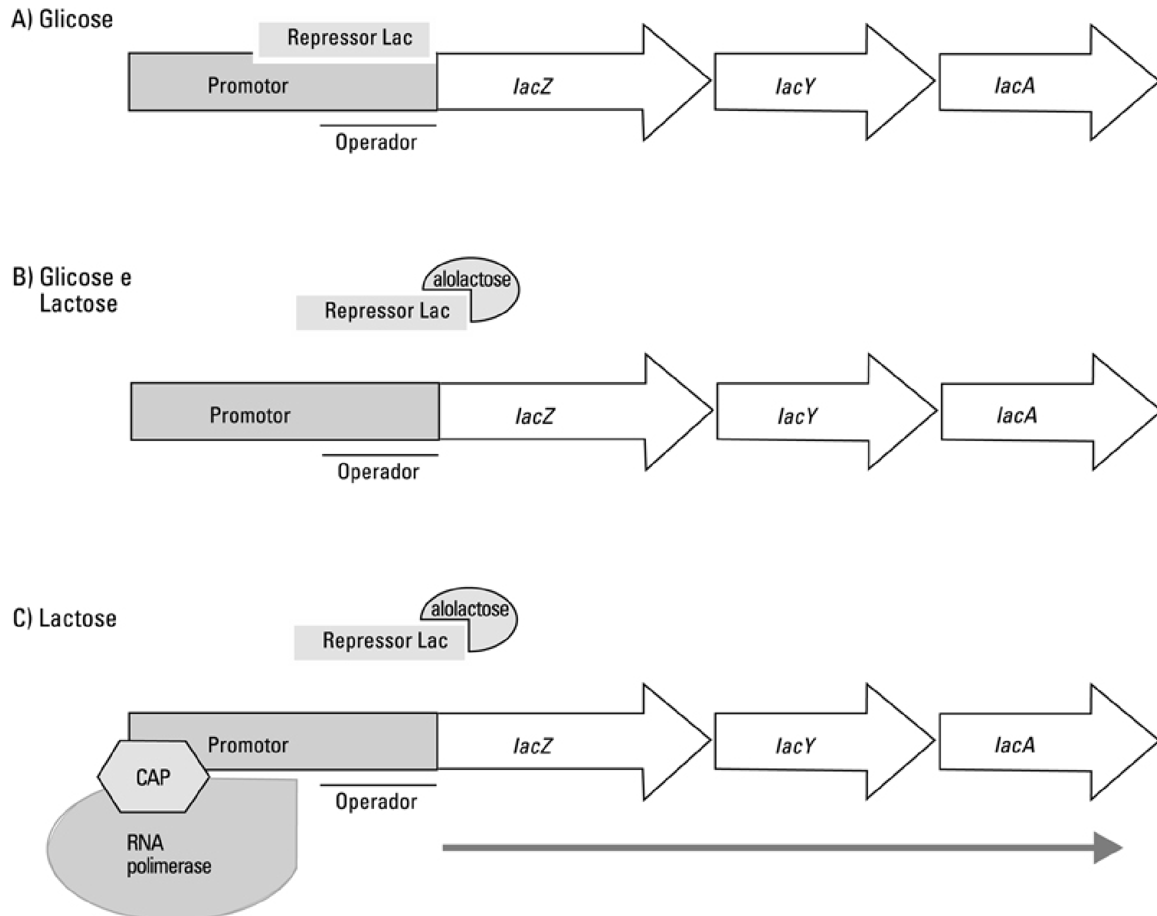


FIGURA 6.6 Repressão e indução catabólica no operon *lac*. (A) Na presença de glicose e ausência de lactose, ocorre regulação negativa da expressão pela interação da proteína repressora ao operador do operon. (B) Na presença de lactose, a molécula efetora se liga e altera a conformação do repressor *lac*, que se desliga do operon, permitindo a expressão que, contudo, permanece em níveis baixos, pois, na presença de glicose, a proteína ativadora de catabolismo (CAP) não interage com o promotor. (C) Na presença de lactose e ausência de glicose, a regulação positiva da expressão do operon leva a altos níveis de transcritos, pois a interação de CAP com o promotor aumenta a eficiência da RNA polimerase.

6.2.6. Técnicas utilizadas em biologia molecular

As técnicas de biologia molecular são empregadas na engenharia genética para a obtenção de micro-organismos geneticamente modificados com aplicação biotecnológica. Algumas dessas técnicas serão descritas a seguir.

6.2.6.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

A reação de PCR apresenta várias aplicações na biologia molecular, dentre elas destaca-se sua utilização na: clonagem, mutação sítio-dirigida, evolução dirigida de proteínas etc. A principal proposta dessa reação é produzir muitas cópias de uma região específica do DNA como, por exemplo, de um gene que se deseja expressar em uma célula microbiana. Os componentes principais da reação de PCR são: DNA molde, desoxirribonucleotídeos (dNTPs), tampão de reação, os *primers* que flanqueiam a sequência que se deseja amplificar e uma DNA polimerase termoestável. As três etapas principais são: desnaturação, anelamento e extensão (Figura 6.7). Na etapa de desnaturação ocorre a separação da dupla fita da molécula de DNA (molde). Geralmente, essa etapa é conduzida em temperaturas maiores ou iguais a 94ºC. Na etapa de anelamento ocorre o pareamento dos *primers* com a sua região complementar no DNA molde. A temperatura utilizada nessa etapa varia normalmente de 45 a 60ºC, sendo determinada pela quantidade de C e G do *primer*. Na região em que o *primer* anela com o molde ocorre a formação de DNA dupla fita que permite que a DNA polimerase termoestável inicie a elongação do primer, isto é, a síntese, da sequência de interesse. Essa etapa é conhecida como extensão, ocorrendo usualmente a 72ºC. Essas três etapas são repetidas, normalmente mais de 25 vezes, para que a amplificação do gene de interesse seja eficiente. Devido ao fato de os produtos de um ciclo de amplificação servirem como molde para o próximo, cada ciclo sucessivo essencialmente dobra a quantidade de produto de DNA, ou seja, o número de cópias aumenta de forma exponencial.

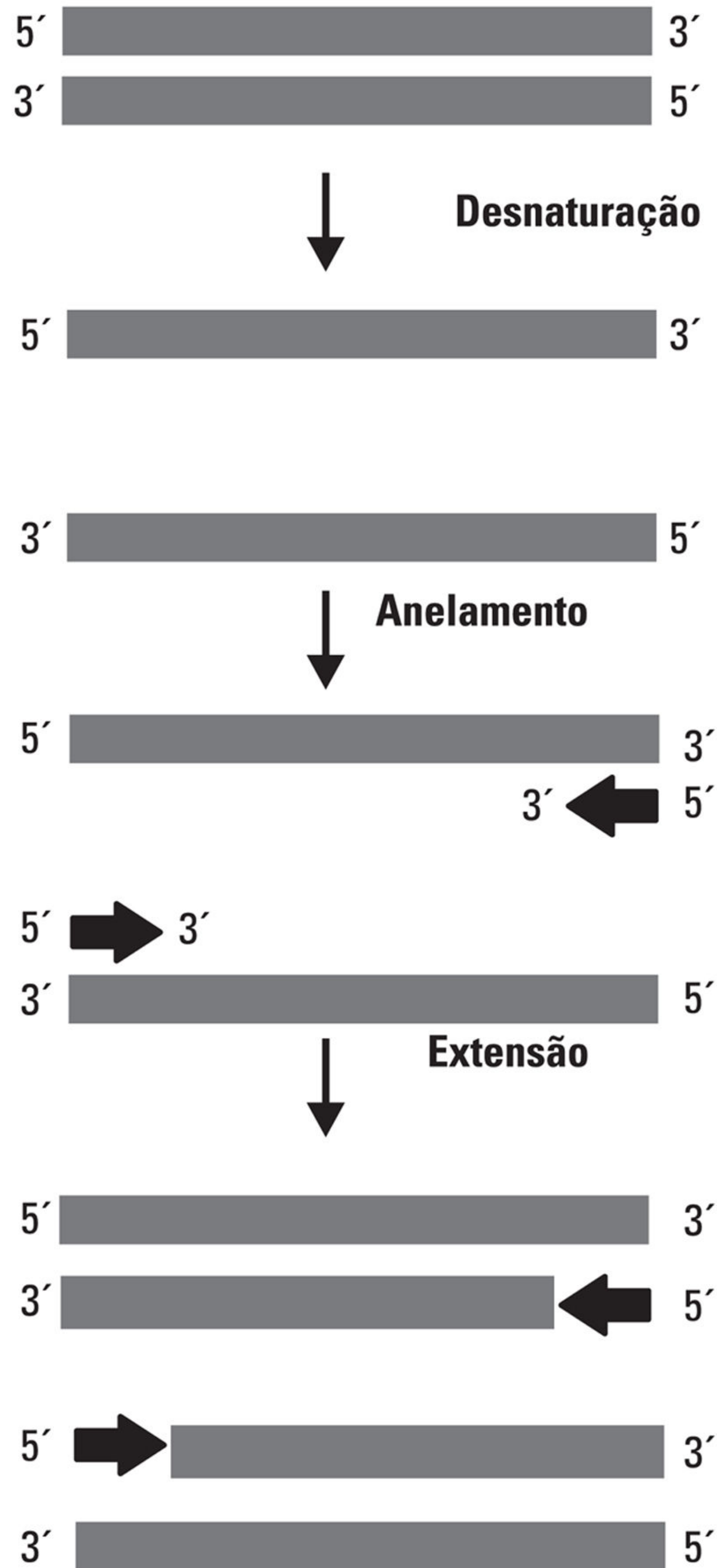


FIGURA 6.7 **Etapas da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). As setas representam os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*).**

6.2.6.2. Eletroforese em gel de agarose

Na clonagem molecular, tanto a obtenção do produto de PCR quanto as reações de clivagem de vetores (vetores serão analisados posteriormente neste capítulo) são confirmadas pela técnica de eletroforese em gel de agarose. Essa técnica é amplamente empregada para separar fragmentos de ácidos nucleicos. A agarose é um polissacarídeo que forma poros ao se solidificar, portanto, o gel é uma rede porosa por onde esses fragmentos migram na presença de corrente elétrica. Como os ácidos nucleicos apresentam carga negativa, eles migram do polo negativo para o positivo. Moléculas menores de ácido nucleico migram mais rapidamente no gel do que as moléculas maiores, pois elas passam mais facilmente pelos poros do gel (Figura 6.8). Utiliza-se o brometo de etídeo para visualizar fragmentos de DNA no gel, pois este intercala entre as fitas de DNA e emite fluorescência quando exposto à luz ultravioleta no comprimento de onda de 260nm. A manipulação de um gel contendo brometo de etídeo deve ser realizada com atenção, pois este é um agente mutagênico e, por este motivo, vem sendo trocado por outros corantes fluorescentes. A grande vantagem do uso desses corantes é que eles não são mutagênicos.

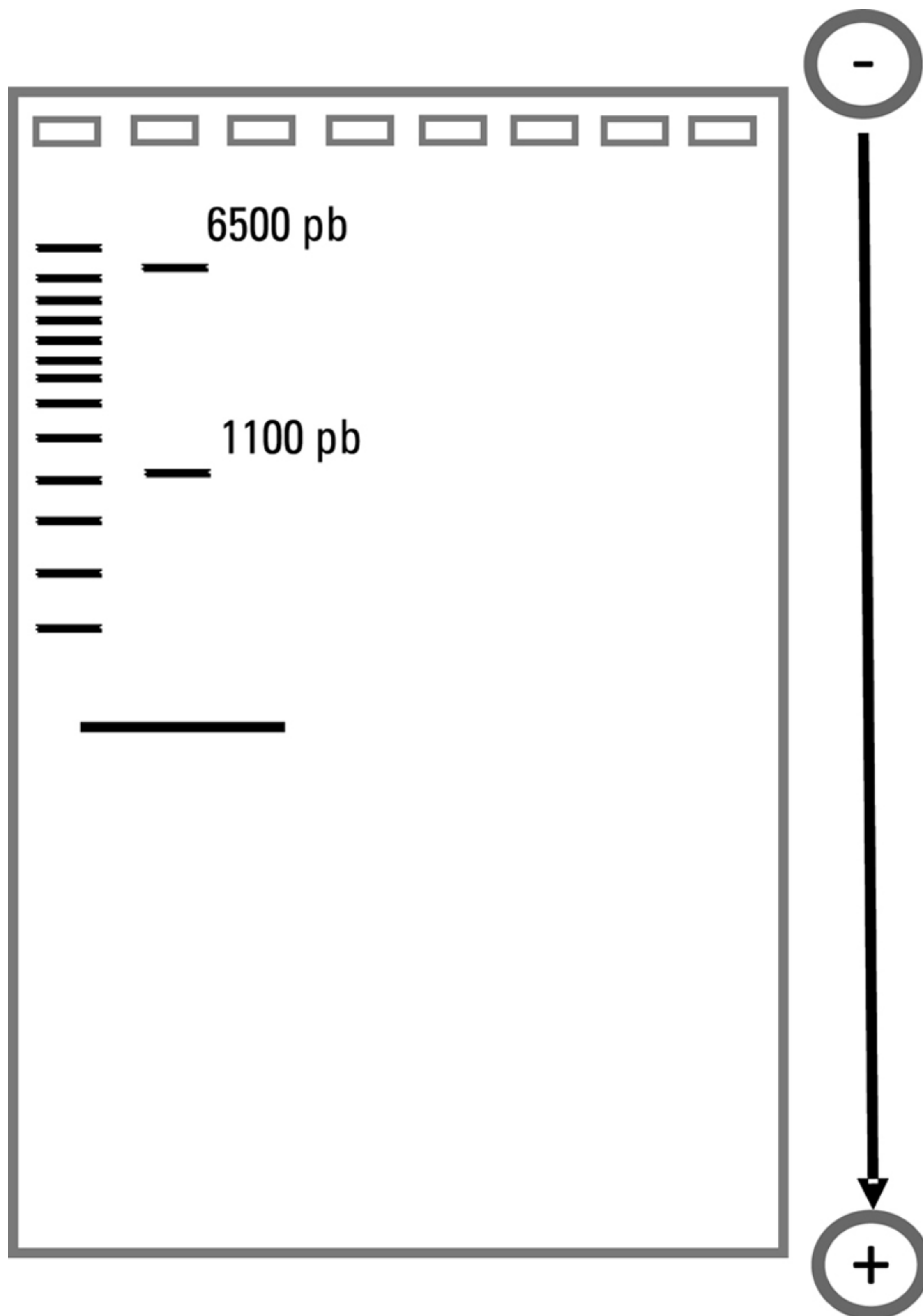


FIGURA 6.8 **Representação da separação de fragmentos de DNA por eletroforese em gel de agarose.**

6.2.6.3. Sequenciamento automático de DNA

Com essa técnica é possível determinar a sequência exata de desoxirribonucleotídeos de um fragmento de DNA. A reação de sequenciamento, semelhante à reação de PCR, também é caracterizada pelas etapas de desnaturação, anelamento e extensão, todavia, apenas um *primer* é utilizado. Além dos dNTPs, também são utilizados didesoxinucleotídeos fluorescentes (ddNTPs) no sequenciamento, contudo em concentrações mais baixas. Como os ddNTPs não têm o grupo hidroxila ligado ao carbono 3' da desoxirribose, a extensão da fita de DNA, catalisada pela DNA polimerase, é interrompida, gerando fragmentos de DNA de tamanhos diferentes. Após a reação de sequenciamento, esses fragmentos de DNA são purificados e, em seguida, separados por tamanho pela técnica de eletroforese em capilar. Ao serem excitados por um laser, esses fragmentos emitem fluorescência em diferentes comprimentos de onda de acordo com a base nitrogenada em que a reação de polimerização foi interrompida. Essa fluorescência é identificada por um detector que transmite os dados para um programa de computador e, após o processamento dos dados, a sequência do fragmento de DNA é determinada (Figura 6.9).

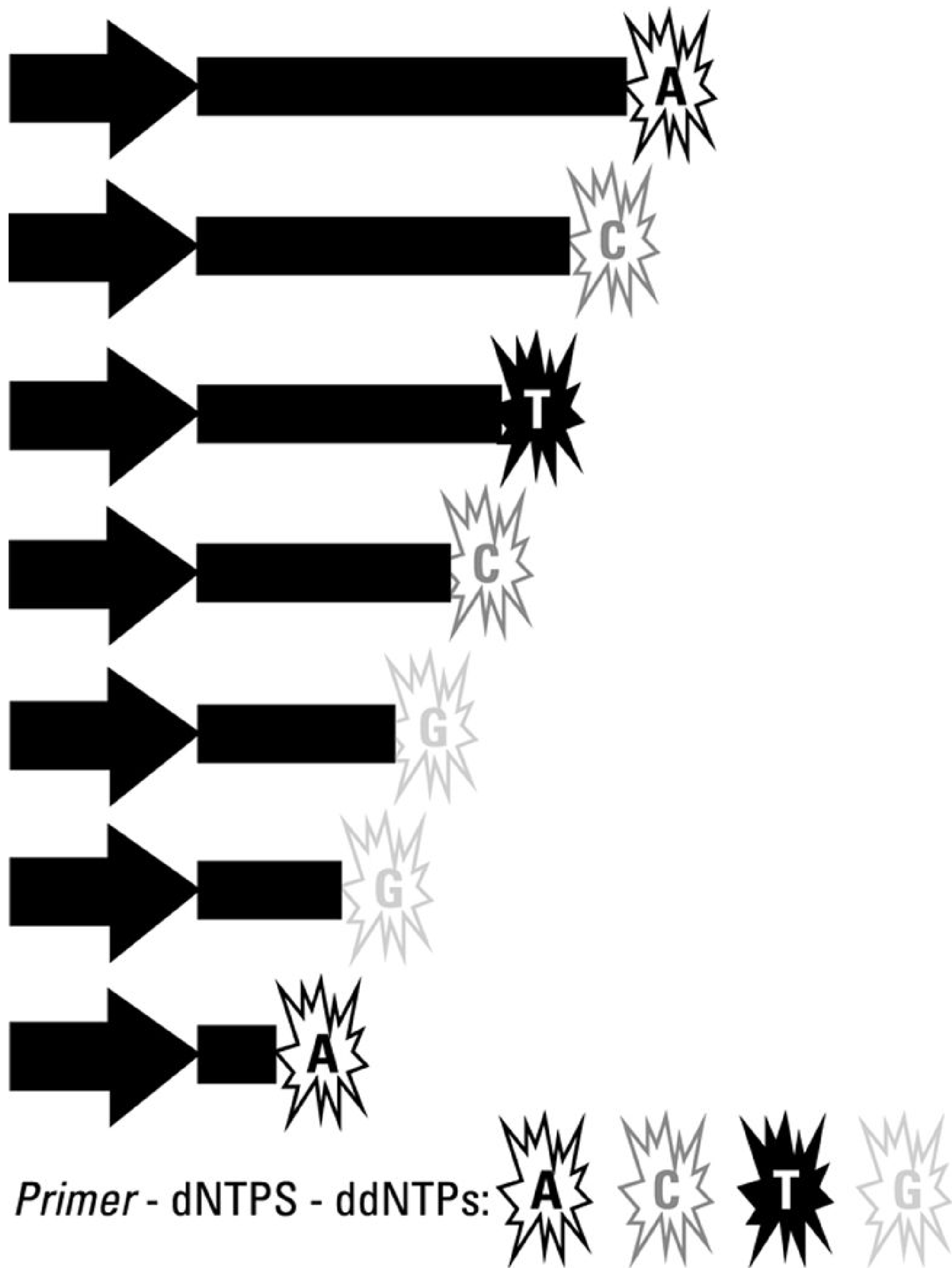


FIGURA 6.9 **Esquema de sequenciamento por eletroforese capilar por detecção dos didesoxirribonucleotídeos marcados por fluorescência.**

6.2.7. Clonagem molecular

A clonagem molecular envolve a ligação de fragmentos de DNA em um vetor de clonagem *in vitro.* A obtenção desses fragmentos requer a utilização de enzimas de restrição, enquanto a ligação dos mesmos é catalisada pela enzima DNA ligase. Após se obter a molécula de DNA recombinante, a etapa seguinte é a sua introdução em um micro-organismo, que é realizada normalmente por transformação. As características e as funções dessas enzimas e de vetores de clonagem serão apresentadas a seguir.

6.2.7.1. Enzimas de restrição

Enzimas de restrição reconhecem e clivam (cortam) sítios de restrição no DNA, que são geralmente sequências palindrômicas de 4 a 8 pares de bases (pb) (Tabela 6.2). Dependendo da enzima utilizada, são gerados fragmentos de DNA com extremidades cegas ou coesivas. Atualmente, uma gama dessas enzimas está disponível comercialmente para ser utilizada em clonagem. Dessa forma, há várias opções para se escolher a enzima adequada para a estratégia de clonagem de interesse. Visto que as enzimas de restrição são isoladas de bactérias, as três primeiras letras do nome de uma enzima de restrição são as abreviações da espécie bacteriana em que a enzima foi isolada, enquanto a quarta letra representa a linhagem bacteriana. Já os números romanos representam quando mais de uma enzima de restrição foi isolada de uma mesma linhagem bacteriana.

Tabela 6.2

Exemplos de algumas enzimas de restrição frequentemente utilizadas em engenharia genética

Enzima de Restrição	Sítio de Restrição
*Bam*HI	5′ GGATCC 3′ 3′ CCTAGG 5′
*Eco*RI	5′ GAATTC 3′ 3′ CTTAAG 5′
*Xho*I	5′ CTCGAG 3′ 3′ GAGCTC 5′
*Sal*I	5′ GTCGAC 3′ 3′ CAGCTG 5′
*Sma*I	5′ CCCGGG 3′ 5′ GGGCCC 3′

6.2.7.2. Vetor

Em clonagem molecular, o gene de interesse é ligado a um vetor, cuja função é carreá-lo e permitir sua replicação dentro da célula hospedeira. O vetor deve ser capaz de se replicar autonomamente na célula de tal forma que o gene de interesse também é replicado. Dentre os vetores de clonagem mais utilizados se destacam os plasmídeos, vetores derivados de fagos (por exemplo, λ) e cosmídeos.

6.2.7.2.1. Plasmídeos

Os plasmídeos são amplamente empregados como vetores, podendo ser utilizados para atender diferentes propostas de clonagem. A maioria desses plasmídeos carreia genes de até oito kilobases -kb (8 mil pares de bases). Os plasmídeos possuem uma origem de replicação que lhes permite replicar autonomamente, e um sítio de clonagem, o qual é clivado por diferentes enzimas de restrição (Figura 6.10). É nesse sítio que ocorre a ligação do gene de interesse. Além disso, os vetores têm uma marca de seleção que possibilita a seleção das células microbianas que os receberam (Figura 6.10).

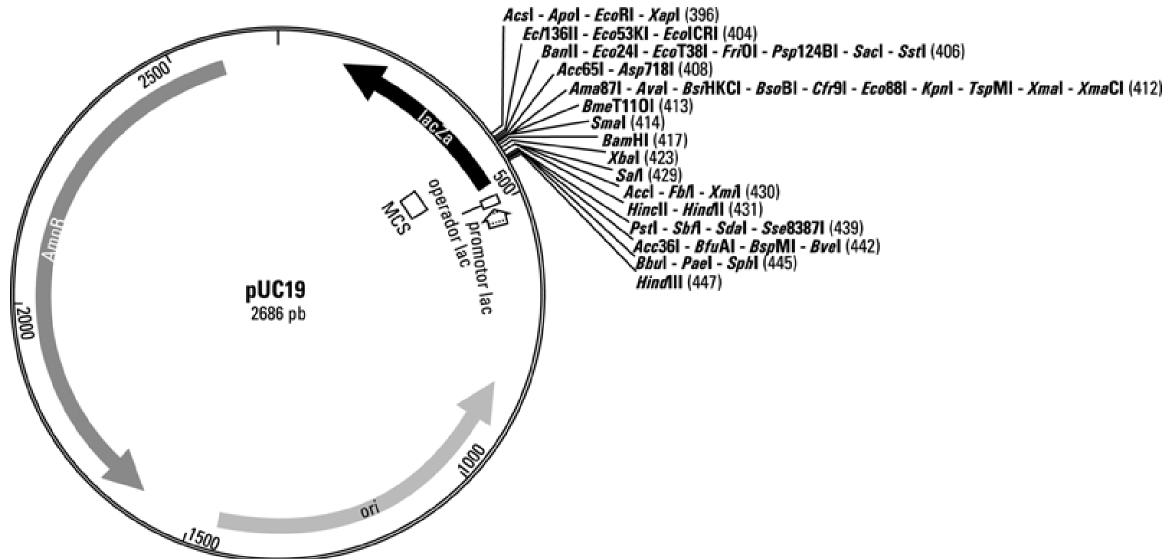


FIGURA 6.10 **Representação do plasmídeo pUC19, destacando a marca de seleção (gene de resistência a ampicilina - Amp^R), a origem de replicação (*ori*), o promotor *lac*, sítio múltiplo de clonagem (MCS) com destaque para as enzimas de restrição que o reconhecem, e o gene *lac*Z que codifica a enzima β-galactosidase. A figura do plasmídeo foi construída a partir da sequência nucleotídica do plasmídeo pUC19 usando o software Snapgene (http://www.snapgene.com/).**

6.2.7.2.2. Vetores λ

O bacteriófago λ também é utilizado como vetor de clonagem, pois este é capaz de injetar o seu material genético em uma célula bacteriana. O gene de interesse obtido por digestão com enzima de restrição é ligado ao DNA do bacteriófago, normalmente digerido com a mesma enzima para a obtenção do gene. A molécula recombinante é empacotada pela adição de extratos virais contendo as proteínas que compõem a partícula viral. Posteriormente, a partícula viral infecta a bactéria hospedeira e a molécula recombinante é injetada na célula bacteriana.

Uma vez que o genoma viral foi reduzido a 15 kb, pela deleção de genes envolvidos em sua integração e excisão (lisogenia) no cromossomo bacteriano, é possível recombinar fragmentos de DNA com praticamente o mesmo tamanho do vetor, o que é uma vantagem em relação aos vetores plasmidiais.

6.2.7.2.3. Cosmídeos

Os cosmídeos são plasmídeos que possuem uma origem de replicação, marca de seleção e as extremidades coesivas do bacteriófago λ. Eles são empregados para a clonagem de fragmentos de DNA que variam de 40 a 50 kb.

6.2.7.3. DNA ligase

A molécula de DNA recombinante é obtida por meio da ligação de duas moléculas, isto é, o gene de interesse e o vetor de clonagem. Essa reação de ligação é catalisada pela enzima DNA ligase. A ligação de fragmentos de DNA que apresentam extremidades cegas é menos eficiente, pois a aproximação e a interação entre as moléculas é menor, dificultando a atividade da DNA ligase. Por outro lado, a ligação de extremidades coesivas é mais eficiente, pois estas extremidades se pareiam de acordo com a complementariedade entre as bases nitrogenadas, formando ligações de hidrogênio.

6.2.7.4. Obtenção de um vetor recombinante

Um vetor recombinante é obtido pela ligação do gene de interesse em um vetor de clonagem. Esse vetor recombinante é introduzido na célula microbiana e, posteriormente, as células que receberam este vetor são selecionadas. Utilizaremos o plasmídeo pUC19 como exemplo de vetor de clonagem (Figura 6.10).

O gene de interesse pode estar em um vetor, por exemplo, um plasmídeo ou em um cromossomo. Geralmente, esse gene é amplificado por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), na qual se utilizam *primers* contendo os sítios de restrição que são reconhecidos pela mesma enzima de restrição utilizada para clivar o vetor de clonagem. Assim, extremidades coesivas serão geradas, as quais são mais fáceis de serem ligadas para se obter a molécula de DNA recombinante. Tanto o vetor, digerido pela enzima de restrição, quanto o produto do PCR, são separados por meio de uma eletroforese em gel de agarose e, em seguida, excisados do gel e purificados, para que, então, sejam ligados pela DNA ligase.

6.2.7.5. Introdução do DNA recombinante na célula hospedeira por transformação

Os micro-organismos mais usados na engenharia genética não são naturalmente competentes para absover DNA exógeno do meio. Sendo

assim, células competentes devem ser preparadas em laboratório. A preparação de células competentes é realizada tanto por transformação por choque térmico, quanto por eletroporação. Embora essas técnicas de transformação sejam diferentes, o princípio é o mesmo, isto é, modificar a superfície celular para que o DNA exógeno seja incorporado pela célula microbiana.

6.2.7.6. Seleção de transformantes

Como mencionado anteriormente, os plasmídeos possuem marcas que permitem a seleção das células transformantes. Muitos plasmídeos têm genes que conferem resistência a antibióticos, que são marcas de seleção amplamente utilizadas na engenharia genética. Após a transformação, as células são plaqueadas em um meio seletivo contendo o antibiótico apropriado para cada marca de seleção.

Apenas as células resistentes ao antibiótico crescem nesse meio, ou seja, aquelas que foram transformadas com o plasmídeo. Por exemplo, o plasmídeo pUC19 tem como marca de seleção o gene de resistência ao antibiótico ampicilina (Figura 6.10), portanto, quando este é usado como vetor, o meio de cultura deve ser acrescido deste antibiótico para seleção apenas das células que o receberam. Note na Figura 6.10, que o sítio de restrição desse plasmídeo encontra-se no gene *lacZ*, que codifica a enzima β-galactosidade. Quando o gene exógeno é ligado ao plasmídeo pUC19, o gene *lacZ* é inativado. Isso é importante para distinguir as células que receberam o vetor apenas circularizado, sem o gene de interesse, daquelas que receberam o vetor recombinante. No meio seletivo também são adicionados o indutor da expressão (promove o desligamento do repressor), isopropil β-D-1-tiogalactopiranosídeo (IPTG) e o substrato cromogênico 5-bromo-4-cloro-3-indoxil-β-D-galactopiranosídeo (X-gal), análogo da lactose, que ao ser clivado pela enzima β-galactosidase libera uma molécula indólica, de coloração azul. Se o gene *lacZ* for inativado, as colônias bacterianas permanecerão brancas, indicando que tais colônias receberam o DNA exógeno de interesse ligado ao pUC19. Já colônias azuis são formadas por células que receberam o plasmídeo recircularizado, ou seja, as células foram transformadas mas não possuem o gene de interesse.

6.2.7.7. Conferindo a construção do vetor recombinante

Algumas colônias brancas são cultivadas em meio seletivo e os plasmídeos são isolados para verificar se o gene de interesse foi corretamente inserido no sítio de clonagem. Esses plasmídeos são digeridos com enzimas de restrição e, em seguida, os fragmentos são separados por eletroforese em gel de agarose para analisar se estes possuem o tamanho esperado para o vetor recombinante. Aqueles que apresentam os fragmentos esperados são sequenciados para confirmar a sequência do gene (inserto).

6.3. Mutação

Erros durante a replicação do DNA são eventos relativamente raros, em geral, variando de 10^6-10^7 pareamentos certos para cada erro. Quando ocorre um erro de pareamento de bases, enzimas específicas do sistema de reparo do DNA são acionadas e a(s) base(s) errada(s) é(são) removida(s) e é(são) adicionado(s) o(s) nucleotídeo(s) correto(s). Quando estes erros não são corrigidos e são perpetuados para as próximas gerações, diz-se que ocorreu uma mutação. Desta maneira, mutante seria um organismo que possui uma alteração no DNA resultante de uma mutação, o que o diferencia da cepa selvagem, que é aquela que não sofreu mutação. Em geral, as mutações são consideradas deletérias, ou seja, diminuem a capacidade de sobrevivência do organismo no ambiente. Por outro lado, algumas podem tornar o organismo mais adaptado ao seu ambiente e, sendo assim, as mutações são consideradas o principal "motor" da evolução.

6.3.1. Tipos de mutação

Todos os organismos estão sujeitos a um certo número de mutações devido aos erros intrínsecos das enzimas responsáveis pela replicação do DNA ou mesmo pelas interações aleatórias com o ambiente. Um exemplo de interações com o ambiente são os radicais livres, presentes naturalmente em meios aquosos, que podem ocasionar alteração do código genético de uma célula. Estas mutações são chamadas de mutações espontâneas e ocorrem em uma taxa específica para cada organismo, ou seja, apresentam um nível basal (*background level*). Entre as mutações espontâneas que merecem destaque estão as modificações tautoméricas, que ocorrem devido à movimentação dos átomos de hidrogênio de uma região para outra na base nitrogenada (Figura 6.11). As formas mais estáveis da timina e guanina são chamadas de cetônicas, e da adenina e citosina, de amínicas, já suas formas tautoméricas são denominadas de enólicas e imínicas, respectivamente. Uma vez que as bases tautoméricas não são idênticas às normais, durante a replicação do DNA, erros de pareamento tornam-se comuns devido à sua presença. Por exemplo, uma adenina na forma imínica pode parear-se com mais frequência com uma citosina do que com uma timina.

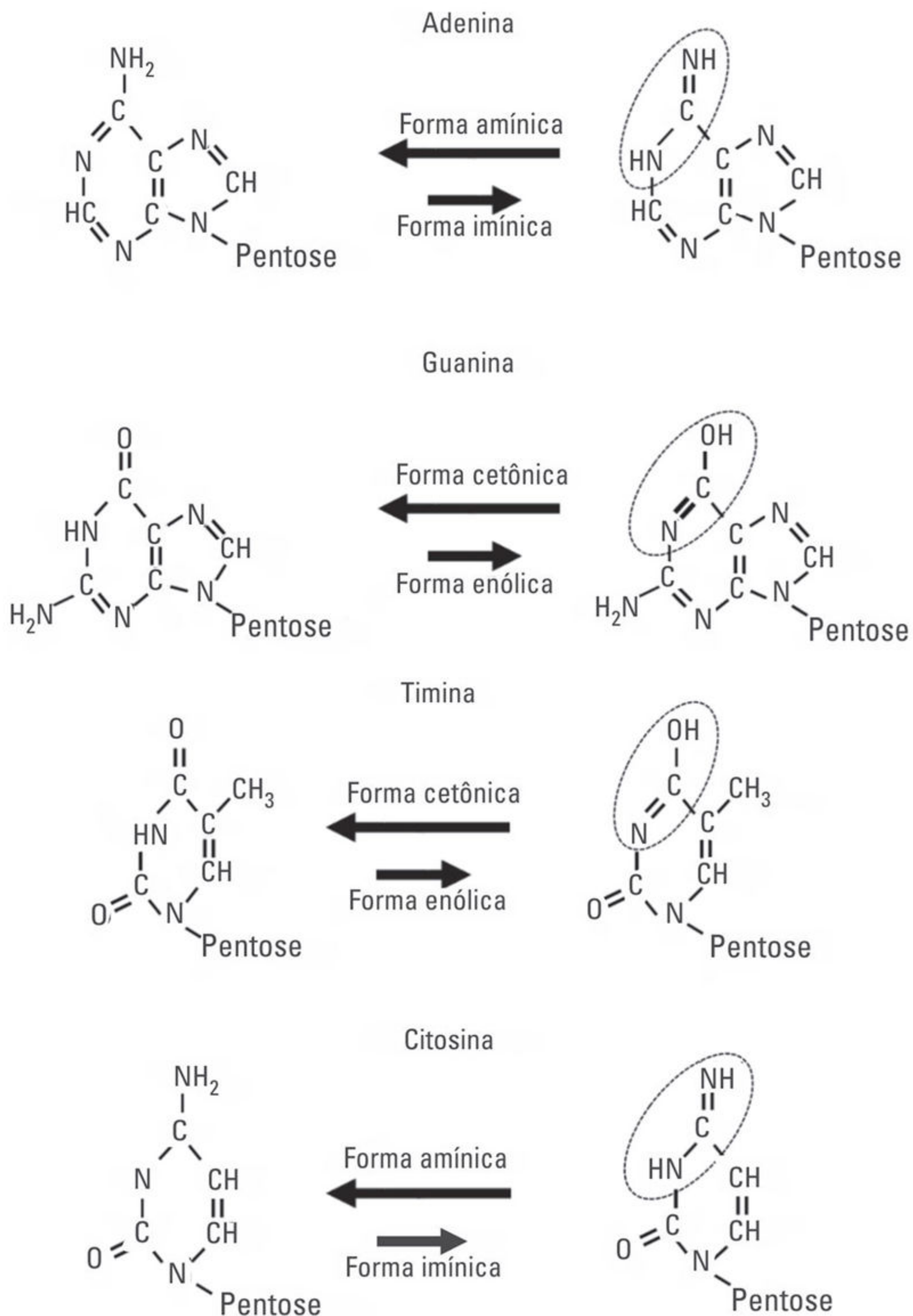


FIGURA 6.11 **Bases nitrogenadas e suas respectivas formas tautoméricas. O círculo pontilhado indica a região onde ocorre a troca de posição dos átomos de hidrogênio.**

Apesar de as mutações serem eventos raros, há regiões no DNA que apresentam, naturalmente, uma taxa de mutação superior às demais (até 100 vezes maior); estes locais são chamados de *hotspots* (pontos quentes). Uma das principais causas da formação dos *hotspots* é a presença de bases nitrogenadas modificadas, em regiões específicas do DNA. Um exemplo de base modificada é a 5-metilcitosina que é formada pela adição de um grupamento metil em uma citosina pela enzima metilase, presente na bactéria *E. coli*. Quando há a presença de 5-metilcitosina no DNA, com frequência relativamente alta, há a substituição do grupo amino pelo ceto formando assim, timina. Estando presente esta modificação, no momento da replicação, uma das fitas apresentará uma mutação e, ao invés de formar um par C =G, formará um par T = A.

As alterações do DNA podem ocorrer de maneiras distintas, podendo gerar mutações de efeitos variados no organismo, de acordo com o grau de modificação do material genético. Um dos tipos mais comuns de mutações são as mutações pontuais, que consistem na alteração em um único par de base no DNA. Quando um par de base é substituído por outro (por exemplo, quando há a troca de uma adenina por uma timina), ocorre uma mutação por substituição. Quando há a troca de uma pirimidina por uma purina ou vice-versa, a mutação por substituição é chamada de transversão (Figura 6.12). Já quando ocorre a troca de uma pirimidina por outra pirimidina, ou uma purina por outra purina, a substituição é chamada de transição, sendo esta mais comum do que as transversões (Figura 6.12).

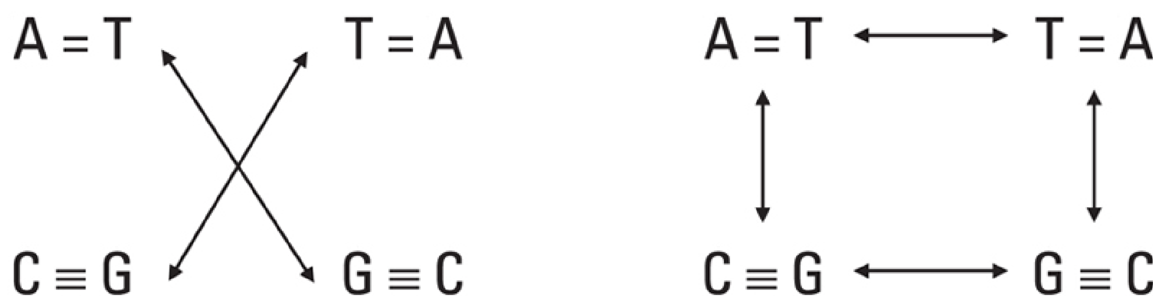


FIGURA 6.12 Modelo esquemático demonstrando os dois tipos de substituições: transições (esquerda) e transversões (direita).

Outros tipos de mutações pontuais, além da substituição, são aquelas originadas a partir da adição ou da deleção (remoção) de um par de base no DNA (Figura 6.13). Quando há um pequeno número de adições ou

deleções de bases nitrogenadas no genoma, diz-se que houve microadições ou microdeleções (Figura 6.13). Nestes casos, pode haver um segundo tipo de mutação que é chamado de mudança de quadro de leitura ou *frameshift mutations* (Figura 6.13). Mutações que alteram o quadro de leitura são capazes de alterar toda a estrutura de uma proteína, pois os códons (trinca de nucleotídeos que codificam um aminoácido) serão lidos de maneira diferente da usual durante a tradução. Desta maneira, mutações que alteram o quadro de leitura, em geral, possuem um efeito mais deletério do que mutações por substituição. Isso ocorre porque elas impedem a correta síntese proteica devido à alteração da leitura de todos os códons a partir do local onde ocorreu a mutação. Quando as mutações inativam completamente a função de um gene, estas são chamadas de mutações diretas (*forwards mutations*) e o mutante é chamado de mutante nulo. Já mutações que não afetam a função de um gene são chamadas de silenciosas ou neutras (Figura 6.13). Por outro lado, quando ocorre a troca de um códon que normalmente iria originar um aminoácido por um códon de término de tradução, a mutação é chamada de sem sentido (Figura 6.13). Caso a função do gene específico não tenha sido totalmente perdida, diz-se que a mutação é do tipo perda de função. Já o oposto, ou seja, o gene apresentar sua função aumentada – mais efetiva – devido à mutação, é dito que houve uma mutação do tipo ganho de função. No entanto, mutações diretas podem ser revertidas, principalmente por meio do sistema de reparo do DNA, sendo que estas novas mutações são chamadas de mutações reversas ou retromutações (*back mutations*).

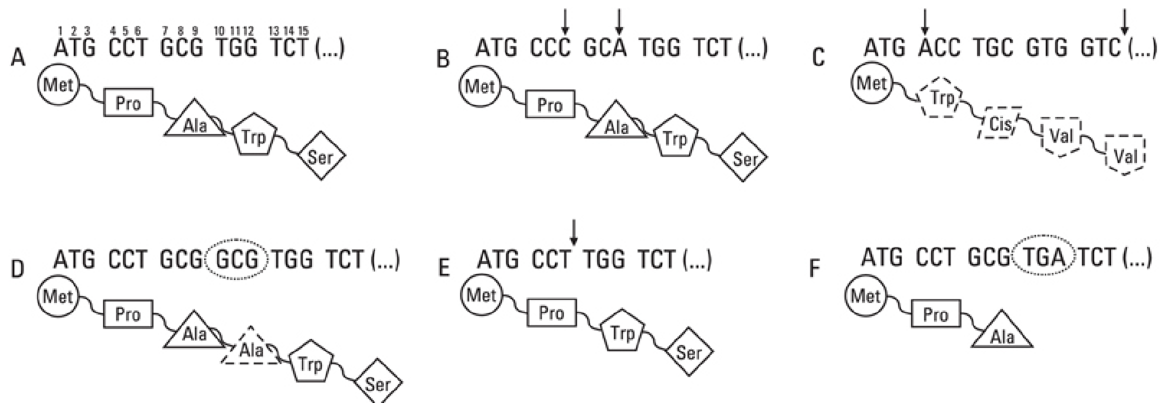


FIGURA 6.13 Representação esquemática de diferentes tipos de mutações. A partir de uma sequência do organismo selvagem podem ocorrer inúmeros tipos de mutações (A). Mutações por substituição, do tipo transição (troca da base 6) e transversão (troca da base 9) não alteraram os aminoácidos da proteína hipotética do esquema, gerando uma mutação silenciosa (B). Em uma mutação do tipo adição (adição de um nucleotídeo entre os nucleotídeos 3 e 4) ocorre uma mudança de quadro de leitura da sequência exemplificada, alterando assim toda a sequência de aminoácido da futura proteína (C). Ocorre a reversão da mutação de mudança no quadro de leitura após a deleção do nucleotídeo 15. Microadições (D) ou microdeleções (E) dependendo do número de nucleotídeos adicionados à sequência de DNA podem alterar pouco a conformação de uma proteína, no caso do exemplo, adicionou-se e removeu-se apenas um aminoácido da proteína. Mutações sem sentido podem ocorrer com a alteração de apenas um nucleotídeo (troca da base 9), interrompendo precocemente a formação de uma proteína (F). As setas e círculos pontilhados indicam o local onde ocorreu uma mutação.

6.3.2. Tipos de mutantes

As mutações podem ter diferentes efeitos no organismo gerando diferentes fenótipos dependendo principalmente: (i) do local onde ocorre a mutação; (ii) da extensão da mutação; (iii) do tipo de mutação que ocorreu; e (iv) do número de mutações geradas. Quando o organismo não consegue sobreviver após uma mutação, diz-se que houve uma mutação letal ou que este era um mutante letal. Apesar de também serem úteis por gerarem conhecimento sobre a importância de diferentes genes no organismo, os mutantes letais são pouco utilizados pois, entre outros motivos, fornecem poucas informações sobre a dinâmica das funções dos genes mutados.

Preferencialmente, são utilizados mutantes letais condicionais que são aqueles viáveis em condições específicas de crescimento.

Destacam-se entre os mutantes letais condicionais os mutantes auxotróficos, aqueles incapazes de sintetizar algum metabólito essencial (como aminoácido, vitamina, base nitrogenada, dentre outros). Desta maneira, quando se deseja que o organismo cresça/reproduza, o meio no qual o organismo é cultivado deve ser suplementado com o metabólito que o mutante é incapaz de sintetizar. Já os mutantes morfológicos são aqueles que apresentam uma forma (morfologia) distinta do organismo selvagem. Como exemplo podemos destacar: a alteração de cor do esporo de fungos filamentosos, a obesidade de ratos de laboratório ou a redução do tamanho das folhas de uma planta. Outros mutantes podem apresentar maior capacidade de resistir a compostos químicos que o selvagem, sendo o principal exemplo os mutantes resistentes a antibióticos. Nestes casos, o organismo passa a não ser suscetível à ação de um antibiótico, sendo que os principais fatores de resistência podem ser a expressão de uma enzima que cliva o composto tóxico, ou pelo transporte do antibiótico para o meio extracelular. Outros mutantes muito utilizados, principalmente na microbiologia, são os mutantes resistentes à ação de bacteriófagos.

6.4. Obtenção de micro-organismos geneticamente modificados

Organismos geneticamente modificados são definidos como aqueles que são geneticamente manipulados para se obter alguma característica de interesse. A engenharia genética vem sendo amplamente empregada nesse intuito, no entanto, micro-organismos mutantes também podem ser obtidos sem a sua utilização. Nesse tópico, serão apresentadas algumas estratégias para obtenção e seleção de mutantes por adaptação evolutiva em laboratório e pelo uso de agentes mutagênicos. No contexto da engenharia genética, introduziremos técnicas de mutagênese que permitem a manipulação de um gene de interesse. Além disso, atenção será dada à expressão heteróloga de proteínas.

6.4.1. Evolução adaptativa em laboratório

O uso da estratégia de evolução adaptativa em laboratório (EAL) vem se mostrando eficiente para a seleção micro-organismos robustos com fenótipos de interesse industrial. Na EAL, os micro-organismos são cultivados por longos períodos, que variam de semanas a anos, sob condições de crescimento bem definidas, o que permite selecionar os micro-organismos mutantes mais adaptados à condição desejada. Essa condição pode ser, por exemplo, tolerância a alta temperatura, a compostos inibidores, capacidade de crescer rapidamente em fontes de carbono abundantes e de baixo custo etc.

Exemplo de fixação

Uso da EAL para obtenção de micro-organismos com fenótipos de interesse industrial

Exemplo 1

A produção de etanol combustível por leveduras termotolerantes é desejável, pois a condução do processo fermentativo a altas temperaturas diminui os custos com o resfriamento das dornas de fermentação e diminui os riscos de contaminação. A EAL foi empregada com sucesso na obtenção de mutantes da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tolerantes a altas temperaturas (CASPETA et al., 2014). Essas

linhagens tiveram o seu genoma sequenciado, o que permitiu identificar os genes que foram mutados. Análises de expressão gênica associadas às análises de fluxo metabólico indicaram que a alteração da composição de esterol na membrana plasmática conferiu termotolerância aos mutantes.

Exemplo 2

Biomassas lignocelulósicas, tais como: resíduos agroindustriais e florestais, são matérias-primas abundantes para a produção de combustíveis e químicos. No entanto, o aproveitamento integral dessas matérias-primas requer que os micro-organismos assimilem de forma eficiente o açúcar xilose, principal constituinte da hemicelulose. A EAL permitiu a obtenção de uma cepa mutante de *Bacillus subitilis* que assimila a xilose de forma mais eficientemente que a linhagem selvagem (ZHANG et al., 2015). O sequenciamento do genoma dessa linhagem mutante identificou as mutações benéficas. Assim, foi construída uma nova cepa contendo apenas as mutações que favorecem a assimilação de xilose. Essa cepa apresentou uma velocidade específica de consumo de xilose, superior à da linhagem mutante selecionada inicialmente.

6.4.2. Mutagênese utilizando agentes físicos, químicos e biológicos

Como mencionado anteriormente, as mutações podem ocorrer naturalmente pelo erro intrínseco de uma enzima ou um pareamento aleatório de uma base em um local inadequado. Entretanto, as mutações podem ser induzidas por meio de agentes mutagênicos que podem ser classificados como sendo dos tipos: (i) físico; (ii) químico; ou (iii) biológico.

6.4.2.1. Agentes mutagênicos físicos

Os principais agentes mutagênicos físicos são as radiações. Radiação é a energia transferida de um sistema a outro, independentemente do meio material, podendo ser originada de diversas fontes como sol, um aparelho de raio X ou uma lâmpada ultravioleta. As radiações ainda podem ser subdivididas em: (i) radiações ionizantes, capazes de remover elétrons de um átomo, e (ii) não ionizantes, capazes de fornecer energia para que os elétrons transitem das regiões menos para as mais energéticas dentro do orbital atômico.

6.4.2.2. Radiações ionizantes – raios X e γ

Os raios X e γ, por serem altamente energéticos, causam grandes danos ao DNA dos organismos vivos, sendo que estes danos podem ser gerados direta ou indiretamente. Diretamente, a radiação pode quebrar as interações químicas da molécula de DNA levando ao rompimento da mesma. Além disso, estas radiações podem ionizar a água formando radicais livres que interagem com o DNA e causam a sua quebra, gerando assim um dano indireto. Devido à grande extensão de danos ao DNA, pode ocorrer o reparo errôneo da dupla-fita, proporcionando a formação de mutantes. Além disso, as radiações ionizantes podem criar grandes alterações no DNA formando aberrações cromossômicas e, até, provocando a morte do organismo.

6.4.2.3. Radiações não ionizantes

As pirimidinas, mais especificamente a timina, possuem a capacidade de absorver, com alta eficiência, comprimentos de onda (λ) na faixa dos 260 nm (comprimento de onda na faixa da radiação ultravioleta). Quando há duas timinas adjacentes, o carbono 4 de uma e o 6 de outra podem, devido ao excesso de energia, formar uma ligação covalente entre si formando o chamado dímero de timina. Um dos efeitos desta estrutura é a alteração da conformação da molécula de DNA, o que interfere na correta replicação do material genético podendo gerar mutações. Outro efeito é que durante a excisão e reparo dos dímeros de timina, podem ocorrer erros neste processamento, podendo provocar, mais uma vez, mutações inespecíficas no local.

6.4.2.4. Agentes mutagênicos químicos

As mutações podem ser induzidas adicionando-se compostos químicos no meio em que o organismo está sendo cultivado. Em geral, esses compostos atuam: (i) substituindo uma base do DNA; (ii) alterando uma base, induzindo assim a erros de pareamento; (iii) danificando uma base, impedindo assim o pareamento correto da mesma; ou (iv) intercalando entre as bases, gerando mudanças no quadro de leitura.

6.4.2.5. Análogos de bases

Alguns compostos químicos são semelhantes às bases nitrogenadas podendo, ocasionalmente, serem incorporados à molécula de DNA ao

invés da base original. Por não ser idênticos a um nucleotídeo normal, os mutagênicos, em geral, causam um pareamento errôneo entre as bases durante a replicação, causando assim, uma mutação. O composto 5-bromouracil (5-BU) é um análogo à timina que possui um átomo de bromo no lugar do grupo metil no carbono 5 da timina. *In vivo*, o 5-BU tende a parear mais constantemente com a guanina do que com a adenina.

6.4.2.6. Agentes que levam à alteração de pares de bases

Agentes mutagênicos específicos podem alterar a conformação de uma base levando à formação de pareamentos errôneos no processo de replicação. O etilmetanossulfato (EMS), a nitrosoguanidina (NG) e o gás mostarda nitrogenado (NM) adicionam grupos alquila em diversas posições de qualquer uma das quatro bases nitrogenadas. Isto induz o pareamento errôneo das bases, como, por exemplo, uma guanina alquilada pareando com uma timina.

6.4.2.7. Agentes que causam danos às bases

Alguns mutagênicos são capazes de danificar diretamente as bases nitrogenadas, gerando pareamentos anormais entre as bases. O ácido nitroso desamina as bases nitrogenadas convertendo adenina a hipoxantina, citosina a uracila e guanina a xantina. A hipoxantina pareia com citosina ao invés de timina, a uracila com a adenina ao invés da guanina e a xantina continua pareando com a citosina.

6.4.2.8. Agentes intercalantes

Os agentes intercalantes são moléculas que interagem com a dupla fita de DNA introduzindo-se entre as bases nitrogenadas. Destacam-se como agentes intercalantes a proflavina, a acridina laranja e o composto ICR-191. Devido à estrutura planar destes compostos eles se intercalam entre as bases do DNA, podendo resultar na deleção ou inserção de uma ou mais bases.

Exemplo de fixação

Uso de agentes mutagênicos para a obtenção de micro-organismos com maior produtividade de penicilina

Alexander Fleming em 1928 foi o primeiro investigador que isolou, identificou, e caracterizou um micro-organismo - *Penicillium notatum* - capaz de produzir um antibiótico – a penicilina. A cepa de *P. notatum* isolada por Fleming era capaz de produzir entre 1-3 mg/L de penicilina, sendo que, atualmente, cepas modificadas de *Penicilium* são capazes de produzir concentrações superiores a 50 g/L. O Laboratório Regional de Pesquisas do Norte (NRRL) do Departamento de Agricultura dos Estados Unidos, foi um dos centros de pesquisa empenhados no aumento de produção de penicilina. Os trabalhos deste laboratório se concentraram principalmente no isolamento de novas cepas e seleção de mutantes submetidos a inúmeros agentes mutagêncos. O primeiro avanço significativo nos trabalhos do NRRL foi o isolamento de um fungo - *P. chrysogenum* - capaz de produzir 20 vezes mais penicilina do que o *P. notatum* de Fleming. Após o isolamento de *P. chrysogenum*, o NRRL e diversos outros laboratórios, realizaram, por décadas, inúmeros experimentos de mutações aleatórias utilizando: i) raios X; ii) raios ultravioletas (com λ de 253 e 275 nm) e iii) gás mostarda (NM). Após cada ensaio utilizando os agentes mutagênicos citados, ocorria a seleção de milhares de mutantes obtendo-se, assim, inúmeras cepas com valores distintos de produção do antibiótico. Ao final desses experimentos, utilizando basicamente técnicas de mutação aleatória, foram obtidas cepas capazes de produzir milhares de vezes mais penicilina do que o primeiro micro-organismo isolado por Fleming.

6.4.2.9. Agentes mutagênicos biológicos

As mutações do tipo biológicas são aquelas em que elementos advindos de organismos vivos alteram a sequência normal de bases do DNA, sendo que o principal representante deste tipo de mutação são os transposons.

6.4.2.9.1. Transposons

Elementos de transposição ou transposons são sequências de DNA capazes de alterar sua posição no genoma. Este elemento pode sair do local onde está inserido e ser introduzido em outro, por meio de enzimas específicas. Outro grupo de transposons são aqueles que podem ser replicados e, posteriormente, o novo fragmento ser inserido em um local aleatório no genoma, neste caso, há o aumento do número de transposons no organismo. As características gerais dos transposons são: (i) presença de repetições de nucleotídeos em suas extremidades; (ii) presença de um ou mais genes que podem codificar enzimas para auxiliar em sua

transposição; (iii) criação de pequenas repetições no local onde são inseridos; e (iv) grande número no genoma. Os transposons podem compor até 50% do genoma de um organismo e ser responsáveis por até 80% das mutações espontâneas de uma célula. As mo vimentações destes elementos ao longo do DNA podem gerar inúmeras alterações do ponto de vista bioquímico e funcional no genoma. Transposons, por exemplo, podem inserir-se em um gene, silenciando-o, ou, por outro lado, reverterem uma mutação antiga ao saírem de sua posição original. Nos dois exemplos, o organismo apresentará um novo fenótipo devido à atuação dos elementos transponíveis. Uma alteração indireta da ação dos transposons é a alteração de seu promotor. Inúmeros transposons possuem promotores fortes, e no momento de uma nova transposição estes promotores podem ativar genes silenciados ou aumentar a expressão gênica de genes próximos a eles. As principais alterações estruturais do genoma após a ação de um transposon são: deleções, duplicações, inversões e fusões cromossômicas.

Exemplo de fixação

Uso de transposon na obtenção de uma bactéria tolerante a condições de estresse

Durante a produção de etanol os micro-organismos fermentativos são submetidos há uma série de estresses, dentre eles a escassez de nutrientes (ao final da fermentação) e a altas temperaturas. Para aumentar a resistência da bactéria *Zymomonas mobilis*, produtora de etanol, a estes estresses foram clonados três genes (*yfdZ*, *metB* e *Pfu-sHSP*) no transposon Tn5 e realizou-se a transformação desta bactéria. Os genes *yfdZ*, *metB* são expressos em *E. coli* quando esta é submetida a algum estresse nutricional e o gene *Pfu-sHSP* codifica uma proteína do choque-térmico em *Pyrococcus furiosus*. O resultado desta engenharia genética, utilizando um transposon, foi a obtenção de um mutante capaz de produzir etanol em altas temperaturas, além de sobreviver em meios com baixa concentração de nutrientes. Este mutante ainda apresentou um fenótipo estável (mais de 100 gerações com as mesmas características) e produziu cerca de 10% mais etanol do que o micro-organismo tipo selvagem (JIA et al., 2013).

6.4.3. Mutação sítio dirigida

Mutação sítio dirigida foi primeiro descrita por Hutchison em 1978 utilizando nucleotídeos sintéticos. O conceito básico deste tipo de mutação é substituir um ou um grupo específico de nucleotídeos no genoma de um organismo. Esta técnica permite que o investigador conheça exatamente as regiões do genoma que foram alteradas e por quais bases foram substituídas (Figura 6.14). A mutação sítio dirigida é principalmente utilizada para: (i) melhorar a atividade de uma enzima sem alterar sua estrutura; (ii) identificar a importância de resíduos de aminoácido de uma proteína; (iii) identificar a atividade catalítica de enzimas; (iv) estudar a afinidade substrato/ligante; e (v) estudar a importância de cada base nitrogenada em um gene; dentre outros. Para a obtenção deste tipo de mutante há a necessidade do conhecimento preciso da sequência de nucleotídeos da região-alvo. Um dos procedimentos para a realização desta mutação consiste em amplificar a região específica do gene com um *primer* que possua a mutação que se deseja inserir no DNA. Por exemplo, se há uma sequência 5′(...)ATGCGTAT (...)3′ e se deseja alterar a citosina por uma guanina pode-se construir um primer com a sequência 3′(...)TAC**C**CATA(...)5′. Desta maneira, durante a replicação a nova fita apresentará a citosina trocada pela guanina.

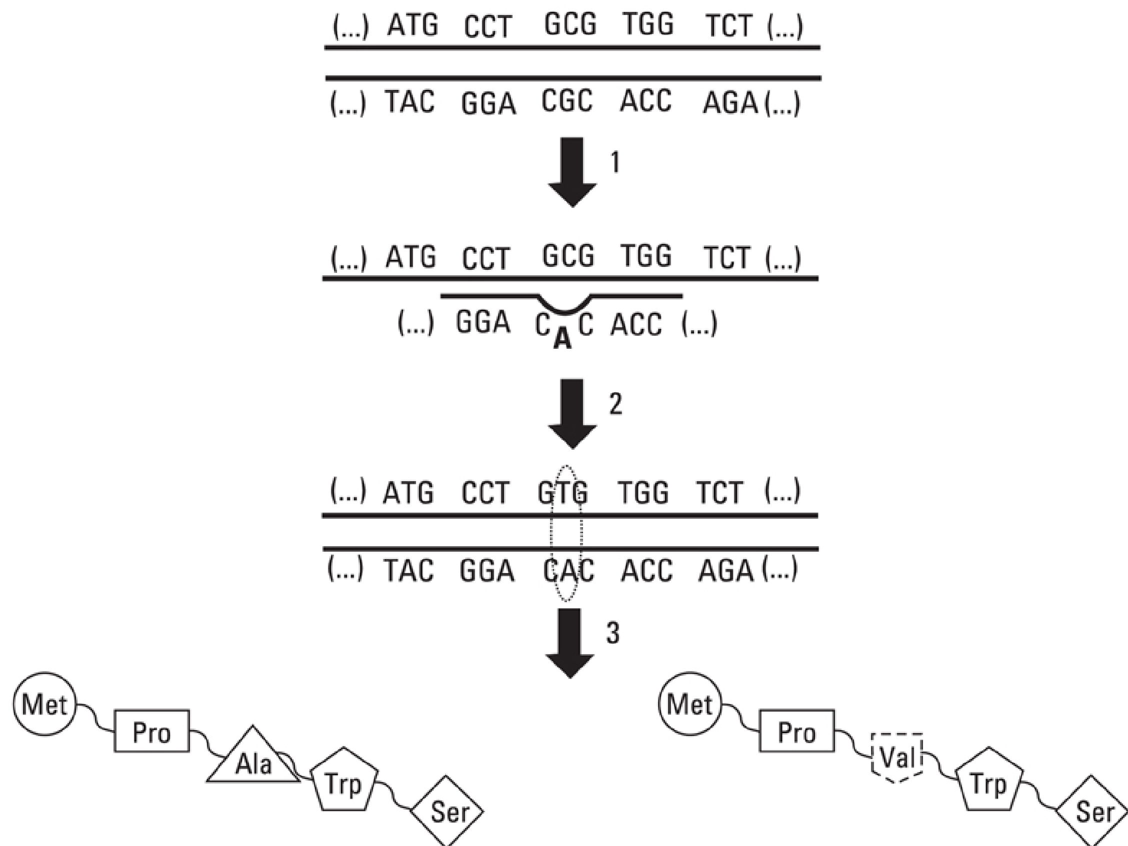


FIGURA 6.14 Esquema demonstrando os procedimentos básicos utilizados em uma mutação sítio dirigida. A partir da sequência original desenha-se um par de *primers* (no esquema, demonstra-se apenas um) com a modificação na base em que se deseja alterar (1). Após o desenho dos *primers*, realiza-se uma reação de PCR e, posteriormente, a sequência modificada é inserida no micro-organismo alvo (2). A sequência modificada, apenas no nucleotídeo de interesse, origina uma nova proteína com um aminoácido modificado (3).

Exemplo de fixação

Uso de mutação sítio dirigida para aumentar a atividade de enzimas de interesse industrial

Endoglucanases são enzimas capazes de hidrolisar a celulose e, por isso, há grande interesse em utilizá-las na produção de etanol celulósico, também chamado de etanol de 2ª geração. A mudança de resíduos de aminoácidos presentes no centro catalítico da endoglucanase de

Trichoderma reesei de aminoácidos levou ao aumento da atividade em valores de pH mais básicos (Dieter Becker, 2001). A alteração de um único aminoácido (troca de tirosina por glicina) no domínio catalítico da endoglucanase da actinobactéria *Acidothermus cellulolyticus*, aumentou em 40% a produção de glicose em comparação com ao selvagem (Rignall *et al.*, 2002). O mesmo aumento também ocorreu com a troca de uma fenilalanina, na posição 476, por uma tirosina na endoglucanase da bactéria *Thermonospora fusca* (Escovar-Kousen *et al.*, 2004).

6.4.4. PCR mutagênico (*Error-Prone PCR*)

Diferentemente da mutação sítio dirigida, em que o objetivo é modificar bases específicas de um gene, a técnica de PCR mutagênico consiste em alterar aleatoriamente a sequência gênica (Figura 6.15). Do ponto de vista biotecnológico, essa técnica é utilizada, principalmente, na construção de bibliotecas com variantes de genes que codificam proteínas de interesse. As mutações benéficas, isto é, responsáveis por melhorar a atividade da proteína podem ser identificadas posteriormente, por sequenciamento. Para obter estas mutações, é necessário o uso de PCR em condições em que normalmente esta técnica não é utilizada. Tradicionalmente, o uso do PCR consiste em obter fragmentos de DNA amplificados com o máximo de fidelidade (sem erros/trocas de bases). Já no PCR mutagênico, a técnica de PCR é realizada em condições em que há a maximização dos erros durante o processo de duplicação de uma sequência. Para que ocorram erros durante a amplificação por PCR, pode-se utilizar as seguintes estratégias: (i) uso de polimerases sem capacidade de correção de erros ou de menor fidelidade; (ii) aumento da concentração de polimerase; (iii) aumento da concentração de $MgCl_2$; (iv) adição de $MnCl_2$; e (v) aumento da concentração de nucleotídeos específicos, como dCTP e dTTP. O produto de PCR mutado, em geral, é clonado em um vetor, sendo posteriormente transformado na célula-alvo.

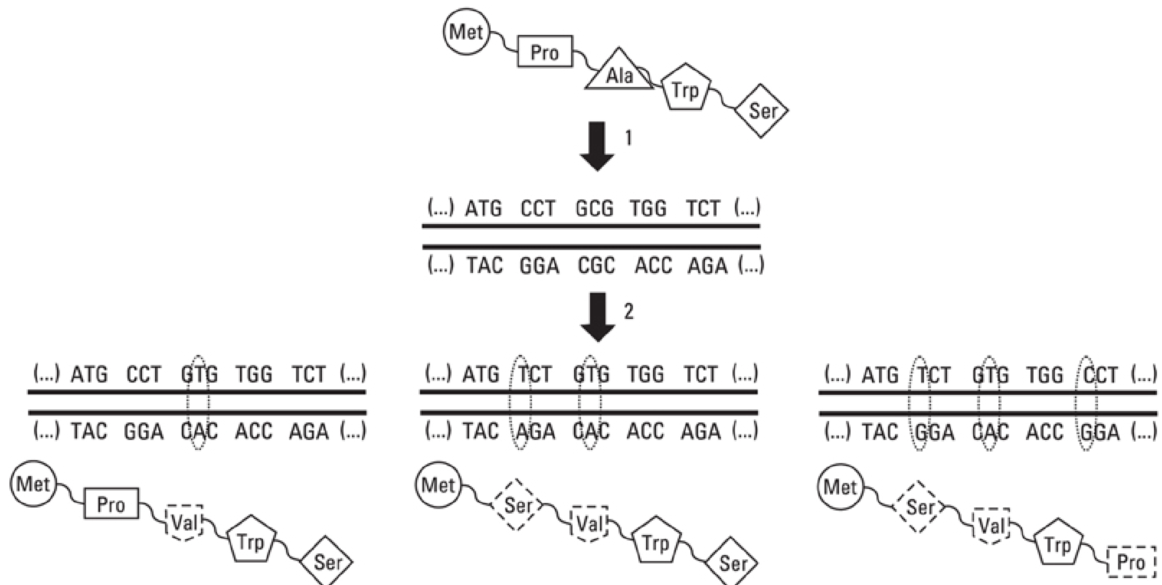


FIGURA 6.15 **Esquema demonstrando a utilização da técnica de PCR mutagênico. A partir da sequência nucleotídica de uma proteína de interesse (1) realiza-se um PCR (2) com fidelidade menor do que a usual. Após a transformação do micro-organismo alvo com a sequência amplificada, pode-se obter diferentes tipos de mutações/mutantes. Os círculos pontilhados indicam os locais onde ocorreram as mutações.**

Exemplo de fixação

Uso de PCR-mutagênico para aumentar a atividade de enzimas de interesse Industrial

A enzima β-glicosidase de *Paenibacillus polymyxia* possui uma meia-vida de 15 minutos a 35°C e não apresenta atividade a 55°C. Com o uso da PCR mutagênico, foram obtidos mutantes de *P. polymyxia* que secretaram uma enzima com meia-vida de 12 minutos a 65°C sem nenhuma alteração de seus parâmetros cinéticos (González-Blasco *et al.*, 2000). Esta técnica também foi utilizada com sucesso na alteração da conformação da enzima 1,4 β-D-glucano glicohidrolase da bactéria *Thermotoga neopolitana*. Essa alteração ocorreu em função do reposicionamento de uma asparagina no sítio catalítico da enzima, o que permitiu aumentar a atividade enzimática (Mccarthy *et al.*, 2004).

6.4.5. Superexpressão de DNA recombinante

Geralmente, o objetivo de se trabalhar com um micro-organismo transformado com um DNA recombinante é alcançar a máxima produção possível da proteína codificada por este DNA. Esta proteina pode ser codificada pelo genoma do micro-organismo em questão, ou a sequência codificadora pode ter sido clonada de outro organismo. Como já dito anteriormente neste capítulo, a regulação da expressão gênica é uma das bases da resposta celular para a alteração nos níveis de uma proteína, embora não seja a única. Assim sendo, para alcançar maiores níveis de produção de uma proteína, uma das principais preocupações é a escolha do promotor a ser recombinado ao DNA de interesse, para que proporcione uma superexpressão (*upregulation*) de tal gene.

Promotores como os dos genes *GAL1* e *GAL10* são utilizados para expressão de DNAs recombinantes porque, além do controle do momento em que o gene deve ser expresso ou não, também são considerados promotores fortes. Um promotor é forte quando se observa um nível elevado de transcritos do gene a que ele está associado, ou seja, uma alta expressão do gene e, portanto, uma alta produção de moléculas de mRNA. Em contraposição um promotor fraco é aquele que apresenta um nível baixo de transcritos devido à baixa expressão do gene. O nível de transcritos neste caso, está associado com a taxa de expressão de um gene; entretanto, o nível de transcritos também pode variar de acordo com a degradação das moléculas de mRNA, influenciando no nível proteico a ser obtido.

Em *E. coli*, um dos mecanismos mais utilizados para a obtenção de altos níveis de expressão e, assim, de alta produção de uma determinada proteína, baseia-se no emprego do operador do operon *lac* e da indução do pelo composto IPTG. A clonagem do DNA de interesse é realizada em um vetor contendo tal operador, que deixa de ser reprimido pelo repressor *lac* quando IPTG é adicionado ao meio de cultura (Figura 6.16). A linhagem de *E. coli* a ser utilizada para expressão (DE3) também é modificada para expressar uma RNA polimerase viral (do fago T7) a qual possui alta afinidade pela sequência do promotor (promotor T7) que constitui o vetor de expressão e, por isso, propicia a superexpressão do gene recombinado. Um vetor de expressão, assim, além de carrear o DNA recombinante, também proporciona a sua expressão em um determinado organismo.

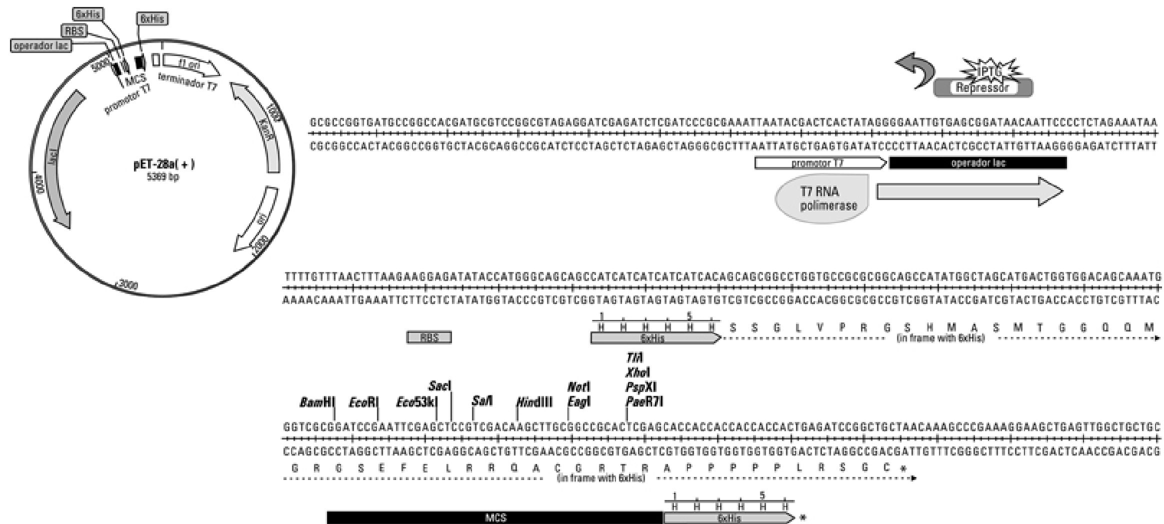


FIGURA 6.16 **Exemplo de vetor de expressão em bactéria (pET-28a(+), Novagen). A indução por IPTG propicia o desligamento da proteína repressora *lac*, permitindo a transcrição pela RNA polimerase do bacteriófago T7.** *Fonte*: A figura do plasmídeo foi construída a partir da sequência nucleotídica do plasmídeo pUC19 com o software Snapgene (http://www.snapgene.com/).

Para expressão em *E. coli*, alguns vetores utilizam o próprio promotor *lac* e a indução por IPTG, mas deve-se lembrar que os níveis de expressão com este promotor não são muito altos na presença de glicose, devido aos baixos níveis intracelulares de AMP cíclico. Outros promotores, baseados no promotor *lac,* também podem ser utilizados, como é o caso do promotor *tac*, um promotor híbrido com o promotor do operon de triptofano (promotor *trp*).

Em leveduras, o sistema de indução derivado da mudança de fonte de carbono também é utilizado como uma ferramenta de biologia molecular para superexpressão de genes. O gene recombinante é geralmente inserido após o promotor de *GAL1* (galactoquinase) ou *GAL10* (UDP-glicose-4-epimerase) e sua transcrição é ativada apenas na presença de galactose e ausência de glicose. Como elucidado no item de indução catabólica, a ausência de glicose e presença de galactose levam à superexpressão do gene de interesse e produção da proteína recombinante por ele codificada. Outros promotores de levedura podem ser utilizados para a superexpressão de proteínas, como: os induzidos por etanol (*ADH1*), por cobre (*CUP1*), ou constitutivos, como os de *PGK1* e *TEF1*. Entretanto, para estes últimos, a expressão do gene de interesse é constitutiva, ou seja, constante e não induzida em um determinado momento.

O processo oposto (*downregulation*), para se obter menor nível de expressão de um gene também é possível. Geralmente para este fim

utiliza-se promotores constitutivamente fracos ou promotores cuja afinidade pela polimerase é reduzida pela presença de alguma molécula. Contudo, é mais comum realizar a deleção do gene nestes casos.

6.4.6. Expressão heteróloga

Expressão heteróloga é o termo utilizado quando o DNA recombinante a ser expresso é pertencente a um organismo diferente daquele que o hospeda.

Para exemplificar, a obtenção de insulina atualmente é feita por tecnologia de DNA recombinante. Sendo a insulina um hormônio de mamíferos, a expressão em *E. coli* das sequências codificadoras das cadeias proteicas que a formam caracteriza uma expressão heteróloga. Anteriormente, a insulina era extraída de animais, como porcos, mas era uma preocupação constante devido à contaminação durante o processo de purificação e às diferenças entre as cadeias proteicas da insulina humana e suína que poderiam provocar alergias. Devido às técnicas de engenharia genética, foi possível obter em bactéria o hormônio tal como produzido pelo organismo humano, em maior escala e em menor tempo. A engenharia genética também permitiu inserir modificações gênicas de forma a se obter diferentes tipos de insulina e facilitar a sua obtenção.

Muitas outras proteínas de interesse terapêutico podem ser assim obtidas, como hormônios de crescimento, fatores de coagulação, interferons e interleucinas (para o tratamento de doenças associadas a desordens imunes e câncer) e também vacinas recombinantes no lugar de vírus atenuados, por exemplo.

Algumas características da maquinaria de transcrição e tradução dos micro-organismos devem ser levadas em consideração quando se pretende obter a expressão de um gene heterólogo:

1. Região promotora e terminadora: as subunidades da enzima RNA polimerase de bactéria e os fatores de transcrição de eucariotos reconhecem sequências específicas da região promotora. Deste modo, a inserção de um promotor de outro organismo pode resultar em um baixo nível de transcrição do gene por uma inadequada interação com a RNA polimerase do hospedeiro. Assim, no processo de inserção de um gene heterólogo em um vetor de expressão, procura-se sempre utilizar o promotor do organismo hospedeiro. Lógica semelhante aplica-se à sequência terminadora, que promove a liberação da fita de mRNA e da polimerase.

2. *Splicing*: opta-se, em geral, por recombinar a sequência codificadora de uma determinada proteína e não a sequência gênica contendo íntrons. Isto ocorre porque o organismo hospedeiro pode não realizar o processo de *splicing* (*E. coli*) ou a região de *splicing* pode não ser efetivamente reconhecida em alguns fungos.
3. Otimização de códons: cada aminoácido é codificado por uma sequência de três nucleotídeos, chamada de códon, sendo que existem 64 possibilidades de combinação de nucleotídeos, mas apenas 20 aminoácidos, assim há mais de um códon para alguns aminoácidos. Cada organismo tem a preferência de uso para um determinado códon, em detrimento dos demais para um aminoácido. Isto faz com que haja uma frequência maior de ocorrência desse códon no DNA e consequentemente haja mais RNAs transportadores de aminoácidos (tRNAs) que interajem com os códons preferenciais. Portanto, ao traduzir o mRNA de um gene heterólogo, mais rápida será a produção da proteína correspondente quanto maior for a abundância dos tRNAs necessários. A otimização de códons é, assim, um ajuste de códons para um mesmo aminoácido levando em conta a preferência (*codon usage bias*) do micro-organismo hospedeiro.
4. Toxicidade: algumas proteínas heterólogas ou seus produtos podem ser tóxicos para a célula hospedeira. A modulação da expressão deve ser uma ferramenta que garanta um balanço entre a viabilidade do micro-organismo e a produção desejada.
5. Modificações pós-traducionais: quando, para ser funcional, uma proteína necessita de modificações após o processo de tradução, a melhor opção, se possível, é a utilização de organismos eucariotos. Neste caso, a levedura *P. pastoris* torna-se um modelo interessante por realizar glicosilação como modificação pós-traducional.

A expressão de um gene heterólogo também pode ser útil para caracterizar sua função ou para identificar interações físicas entre duas proteínas. A função de genes heterólogos (não homólogos) pode ser avaliada em *S. cerevisiae* como é o caso do gene *p53* supressor de tumor em humanos. Por exemplo, pode analisar diversos mutantes de *p53*, além de analisar sua ativação da transcricional. A função de genes homólogos também pode ser avaliada por complementação da sua função em leveduras. Um gene contendo uma deleção pode ser correlacionado com outro, como o gene envolvido no metabolismo de cobre em humanos e leveduras (*SCO1*) e cuja mutação leva a encefalopatias. Testes de interação física entre duas proteínas frente à ativação da transcrição permitiu

descrever, por exemplo, a função do gene *BRCA1*, envolvido em câncer de mama.

Economicamente, o uso de micro-organismos também é interessante para a obtenção de metabólitos. A obtenção de aminoácidos, etanol, ácidos graxos, antibióticos, entre outros, é alcançada a partir do próprio código genético do micro-organismo utilizado. Contudo, há algum tempo, a expressão de genes heterólogos nesses micro-organismos vem permitindo que compostos originários de outras fontes também sejam obtidos. Entre eles, destaca-se a obtenção de ácido artemisínico, precursor do antimalárico artemisinina, α-santaleno, composto aromático e oleoquímicos todos de origem vegetal, além de biocombustíveis; e butanol.

Entre os desafios para a produção de tais compostos, pode-se destacar a necessidade de introdução da via biossintética do produto. Algumas vezes o micro-organismo de escolha biossintetiza alguns precursores, o que facilita a estratégia de produção por meio da expressão de um ou dois genes heterólogos. Por outro lado, algumas vezes é necessário reconstituir a maior parte da via biossintética do composto. Torna-se interessante, também, alterar o nível de expressão ou de degradação relacionados com algumas proteínas do micro-organismo para impulsionar a produção do composto heterólogo. Deste modo, as ferramentas empregadas para manipulação das vias biossintéticas é conhecida como Engenharia Metabólica, uma área de avanços crescentes.

Nestes casos, em que a expressão de alguns genes deve ser adicionada ou alterada na mesma célula, algumas estratégias devem ser empregadas. Quando o trabalho é feito com bactérias, é possível construir um ou mais vetores (com diferentes marcas de seleção e origens de replicação) contendo dois ou mais genes sob controle de apenas um promotor, ou seja, construir um operon. Contudo, para leveduras, a melhor estratégia é empregar a técnica de integração gênica, para que ocorra a troca de promotor de um gene ou a inserção de promotores, genes e terminadores no genoma do micro-organismo hospedeiro. Isto ocorre devido à capacidade destas células de realizarem uma recombinação entre ácidos nucleicos linearizados que possuem regiões de homologia com seu material genômico.

6.5. Biossegurança de organismos geneticamente modificados

Os principais avanços tecnológicos, como a própria engenharia genética, dificilmente são implementados sem controvérsias. A engenharia genética potencialmente afeta muitos aspectos da sociedade moderna como a produção de alimentos, vacinas, medicamentos e, consequentemente, tem implicações diretas nas questões sociais, éticas, legais e econômicas. Desde 1973, ano em que a tecnologia do DNA recombinante foi inicialmente inserida nas pesquisas, existem muitas dúvidas sobre a sua segurança. Portanto, torna-se essencial a regulamentação, com adoção de leis e critérios, sobre o que constitui a biossegurança de organismos geneticamente modificados (OGM) e seus derivados. Um organismo geneticamente modificado é aquele no qual o material genético – DNA/RNA tenha sido modificado por qualquer técnica de engenharia genética. Estas modificações podem estar relacionadas com a obtenção de novas informações, neste caso introdução/aquisição de novas sequências de desoxirribonucleotídeos, como também qualquer deleção de sequências específicas do DNA. Um derivado de OGM corresponde a um produto obtido a partir de OGM, mas que não possui capacidade autônoma de replicação ou que não contenha forma viável de OGM, como, por exemplo, rações feitas a partir de milho transgênico.

Atualmente, é indiscutível a importância da biossegurança em qualquer contexto, seja relacionado com questões ocupacionais ou com o desenvolvimento de pesquisas, sobretudo na engenharia genética, na qual a tecnologia do DNA recombinante é fundamental. De forma abrangente, a biossegurança corresponde a um conjunto de medidas direcionadas à prevenção, minimização ou eliminação de riscos inerentes às atividades de pesquisa, produção, ensino, desenvolvimento tecnológico e prestação de serviços, visando à saúde do homem, dos animais, à preservação do meio ambiente e à qualidade dos resultados. A biossegurança de organismos geneticamente modificados corresponde a todas estas medidas associadas a uma legislação específica, que é elaborada por cada país.

No Brasil, a elaboração das normativas e regulamentação é realizada pela Coordenação Geral da Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), uma instância colegiada multidisciplinar vinculada ao Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação e reestruturada através da Lei 11.105, de 24 de março de 2005. Esta lei estabelece normas de

segurança e mecanismos de fiscalização sobre a construção, o cultivo, a produção, a manipulação, o transporte, a transferência, a importação, a exportação, o armazenamento, a pesquisa, a comercialização, o consumo, a liberação no meio ambiente e o descarte de OGMs e seus derivados. Esta lei tem como diretrizes o estímulo ao avanço científico na área de biossegurança e biotecnologia, a proteção à vida e à saúde humana, animal e vegetal, e a observância do princípio da precaução para a proteção do meio ambiente. A finalidade da CTNBio no âmbito desta lei é prestar apoio técnico consultivo e assessoramento ao Governo Federal no que diz respeito à formulação, atualização e implementação da política nacional de biossegurança relativa aos OGMs. Além disso, a CTNBio estabelece normas técnicas de segurança e pareceres técnicos referentes à proteção da saúde humana, dos organismos vivos e do meio ambiente, para atividades que envolvam a construção, experimentação, cultivo, manipulação, transporte, comercialização, consumo, armazenamento, liberação e descarte de OGM e derivados. O principal papel da CTNBio é acompanhar o desenvolvimento e o progresso técnico e científico nas áreas de biossegurança, biotecnologia, bioética e afins, com o objetivo de aumentar sua capacitação para a proteção da saúde humana, dos animais e das plantas, e do meio ambiente.

A CTNBio é assessorada por uma Comissão Interna de Biossegurança (CIBio), que deve ser criada por toda Instituição que deseja aplicar e desenvolver técnicas e métodos de engenharia genética e/ou realizar pesquisas com OGM e seus derivados; além disso, deve haver um técnico responsável para cada projeto específico dentro da Instituição. As atribuições da CIBio são: (i) informar aos trabalhadores e demais membros da coletividade, quando estes são suscetíveis de serem afetados pela atividade que desempenham; (ii) informar sobre as questões relacionadas com a saúde e a segurança, bem como sobre os procedimentos em caso de acidentes com OGM; (iii) estabelecer programas preventivos e de inspeção para garantir o funcionamento das instalações sob sua responsabilidade, dentro dos padrões e normas de biossegurança, definidos pela CTNBio; (iv) encaminhar à CTNBio documentos, para efeito de análise, para registro ou autorização; (v) manter registro do acompanhamento individual de cada atividade desenvolvida com OGM ou seus derivados; (vi) notificar qualquer problema ocorrido em relação à biossegurança com OGMs (exposição de pessoas, escape para o ambiente) à CTNBio; e (vii) investigar a ocorrência de acidentes e enfermidades que possam estar relacionados com o OGM e seus derivados, notificando o parecer e as providências a serem tomadas.

Inicialmente, qualquer medida de biossegurança para ser corretamente aplicada requer o conhecimento prévio dos agentes de risco envolvidos e a probabilidade do dano proveniente destes, considerando neste caso o risco inerente proveniente do organismo sem modificações, associado ao fato de este ter sido modificado geneticamente. Portanto, o estabelecimento de uma relação direta entre a classe de risco do agente biológico e o nível de biossegurança (NB) deve ser adotado como critério para a definição da forma de manipulação e contenção do OGM específico. A contenção pode ser definida como um conjunto de medidas que não permitam o escape ou a liberação do OGM e seu derivado para o meio ambiente, podendo ser realizado em pequena ou grande escala.

6.5.1. Classes de risco

De acordo com a CTNBio, o risco corresponde à possibilidade de ocorrência de um evento negativo, cientificamente fundamentado, para a saúde humana e de animal, além de danos a vegetais, a outros organismos e ao meio ambiente, decorrente de processos ou situações que envolvam OGM e/ou seus derivados.

De acordo com a Resolução Normativa N° 2, de 27 de novembro de 2006 – CTNBio, os critérios usados para a classificação de riscos associados aos OGMs são os seguintes: (i) potencial patogênico dos organismos doador e receptor do material genético; (ii) o tipo de sequência nucleotídica transferida; (iii) a expressão desta no organismo receptor; e (iv) o OGM resultante e seus efeitos adversos à saúde humana e animal, aos vegetais e ao meio ambiente. Para genes que codificam produtos nocivos à saúde humana e animal, aos vegetais e ao meio ambiente, o vetor utilizado deverá apresentar características que previnam o escape e a manutenção destes na natureza.

É recomendável que todo organismo geneticamente modificado apresente um marcador genético capaz de identificá-lo dentre uma população da mesma espécie, funcionando como um “código de barras” para que a sua detecção seja precisa e eficiente.

OGM e derivados podem ser caracterizados de acordo com o risco que representam a seres humanos e animais e, consequentemente, com o NB exigido para a sua manipulação (Tabela 6.3).

Tabela 6.3

Classes de risco e níveis de biossegurança adotados no trabalho com OGM

Classe de risco CR	Nível de biossegurança NB	Principais procedimentos e equipamentos de segurança[a]	Exemplos de micro-organismos[b]
1	1	Elaboração de Procedimento Operacional Padrão (POP) para cada atividade realizada. Uso de equipamentos de proteção individual (avental, luvas, óculos de proteção, máscaras); cabine de segurança nível 1.	*Escherichia coli* DH5α, HB101, LE392, XL1-Blue, ou qualquer outra linhagem desta espécie usada na tecnologia do DNA recombinante como receptora de vetores. *Bacillus subtilis*. Demais agentes biológicos não incluídos nas classes de risco 2, 3 e 4 e que não demonstraram capacidade comprovada de causar doença no homem ou em animais sadios.
2	2	Elaboração de Procedimento Operacional Padrão (POP) para cada atividade realizada. Uso de equipamentos de proteção individual (avental, luvas, óculos de proteção, máscaras), após o uso, os equipamentos de proteção individual não descartáveis devem ser limpos e guardados fora da área contaminada e as pessoas devem ser treinadas para seu manuseio e guarda apropriada; cabine de segurança biológica (Classe I ou II) e autoclave simples dentro do ambiente de manipulação do OGM, para que todo material gerado seja descontaminado antes de ser removido do local de contenção.	*Salmonella* ssp, todos os sorotipos; *Listeria monocytogenes*; *Shigella* spp; *E. coli*, todas as cepas enteropatogênicas, enterotoxigênicas, enteroinvasivas e detentoras do antígeno K1; *Schistosoma japonicum*, *S. mansoni*; *Toxoplasma* spp; *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus*; Adenovirus humanos, caninos e de aves; Papillomavirus, todos os tipos, incluindo os vírus de papilomas humanos; Epstein-Barr vírus (EBV)1.

Classe de risco CR	Nível de biossegurança NB	Principais procedimentos e equipamentos de segurança[a]	Exemplos de micro-organismos[b]
3	3	Elaboração de Procedimento Operacional Padrão (POP) específico de acordo com o organismo manipulado. Utilização de equipamentos de proteção individuais especiais para circulação interna. O sistema de ar nas instalações deve ser independente e deve prever uma pressão diferencial e fluxo unidirecional de modo a assegurar diferencial de pressão que não permita a saída do agente de risco. No sistema de ar devem estar acoplados manômetros, com sistema de alarme, que acusem qualquer alteração sofrida no nível de pressão exigido para as diferentes salas e não deve existir exaustão do ar para outras áreas do prédio. O ar de exaustão não deve, portanto, ser recirculado e deverá ser filtrado através de filtro HEPA antes de ser eliminado para o exterior das instalações, devendo haver verificação constante do fluxo de ar nas instalações. Todos os procedimentos que envolvem a manipulação de OGM de classe de risco 3 devem ser conduzidos dentro de cabines de segurança biológica Classe II ou III. Necessidade de autoclave dupla porta para descontaminação dos materiais.	*Bacillus anthracis*; *Brucella* spp, todas as espécies; *Clostridium botulinum*; *E. coli*, cepas verotoxigênicas como 0157:H7 ou O103; *Mycobacterium bovis*, exceto a cepa BCG, *M. tuberculosis*; *Rickettsia akari*; *Yersinia pestis;* *Coccidioides immitis*; *Histoplasma capsulatum*; Vírus HIV.
4	4	Elaboração de POP específico. As instalações e procedimentos exigidos para o NB4 devem atender as especificações estabelecidas para o NB1, NB2 e NB3 acrescidos de utilização de equipamentos de proteção individuais especiais para circulação interna, roupas de proteção pessoal com pressão positiva, vetntiladas por sistema de suporte de vida. Cabines de segurança biológica Classe III; autoclave porta dupla. Sistemas específicos de tratamento de efluentes. Completo isolamento de demais áreas.	*Cowdria ruminatium* (heart water) *Theileria annulata*, *T. bovis*, *T. hirci*, *T. parva* e agentes relacionados Vírus da aftosa com seus diversos tipos e variantes Vírus ebola

[a] CTNBio. Resolução Normativa 2, de 27 de novembro de 2006.

[b] Classificação de Risco dos Agentes Biológicos, Ministério da Saúde (2006).

Desta forma, as classes de risco propostas são:

Classe de Risco 1 – CR1 (baixo risco individual e baixo risco para a coletividade): OGM que contém sequências de DNA/RNA de organismo doador e receptor que não causem danos à saúde humana e animal, e efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente;

Classe de Risco 2 – CR2 (moderado risco individual e baixo risco para a coletividade): OGM que contém sequências de DNA/RNA de organismo doador ou receptor com moderado risco de agravo à saúde humana e animal, que tenha baixo risco de disseminação e de causar efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente.

Classe de Risco 3 – CR3 (alto risco individual e risco moderado para a coletividade): OGM que contém sequências de DNA/RNA de um organismo doador ou receptor, com alto risco de agravo à saúde humana e

animal, que tenha baixo ou moderado risco de disseminação e de causar efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente.

Classe de Risco 4 – CR4 (alto risco individual e alto risco para a coletividade): OGM que contém sequências de DNA/RNA de organismo doador ou receptor com alto risco de agravo à saúde humana e animal, que tenha elevado risco de disseminação e de causar efeitos adversos aos vegetais e ao meio ambiente.

6.5.2. Níveis de biossegurança

A manipulação dos micro-organismos pertencentes a cada uma das quatro classes de risco requer níveis de segurança e contenção necessários que possam permitir que o trabalho seja realizado de forma segura para os seres humanos. Os níveis de contenção são denominados de níveis de biossegurança (NB). O nível de biossegurança de atividades e projetos será determinado segundo o OGM de maior classe de risco envolvido. Assim, como as classes de risco, são considerados quatro níveis de biossegurança denominados: NB1, NB2, NB3 e NB4, sendo o último associado à maior complexidade em relação ao nível de proteção, de acordo com a classe de risco do OGM.

A seguir, os principais requerimentos para cada NB:

Nível de Biossegurança 1 – NB1: é o nível de contenção que deve ser aplicado aos laboratórios onde são manipulados OGM da classe de risco 1. Neste caso, não é necessário que as instalações estejam isoladas das demais dependências físicas da instituição, sendo as atividades e projetos conduzidos geralmente em bancada, biotério ou casa de vegetação, devendo os locais e equipamentos serem devidamente idenficados com o símbolo universal de risco biológico. O local deve ter acesso restrito à equipe técnica e de apoio, que deverá ter treinamento específico nos procedimentos realizados nas instalações e deverá ser supervisionada por um técnico principal. As instalações NB1 devem ser planejadas de modo a permitir fácil limpeza e descontaminação, apresentando bancadas de materiais não porosos e que não sejam permeáveis à água e que seja resistente a ácidos, álcalis, solventes orgânicos e a calor moderado. Todo resíduo líquido ou sólido gerado deve ser descontaminado antes de ser descartado, assim como todo material ou equipamento que entrou em contato com o OGM e todo material contaminado só poderá ser retirado das instalações em recipientes rígidos e à prova de vazamentos.

Nível de Biossegurança 2 – NB2: é o nível de contenção que deve ser aplicado aos laboratórios onde são manipulados OGM da classe de risco 2.

Neste caso, as instalações e procedimentos exigidos para o NB2 devem atender às especificações estabelecidas para o NB1 acrescidas da necessidade de uma autoclave disponível em seu interior, de modo a permitir a descontaminação de todo o material antes do descarte, sem o trânsito do OGM por corredores e outros espaços não controlados. Há a necessidade de se utilizar cabines de segurança biológica (Classe I ou II).

Nível de Biossegurança 3 – NB3: é o nível de contenção que deve ser aplicado aos laboratórios onde são manipulados OGM da classe de risco 3. As instalações e procedimentos exigidos para o NB3 devem atender às especificações estabelecidas para o NB1 e o NB2, acrescidos de especificações como uma separação física entre instalações NB3 e as demais instalações, laboratórios ou corredores de acesso. O acesso deverá ser por sistema de dupla porta, com fechamento automático por intertravamento e com antessala para troca de roupas, chuveiros, bloqueio de ar e outros dispositivos, para acesso em duas etapas. As instalações NB3 devem ter fonte de energia de emergência com acionamento automático, suprindo todas as necessidades energéticas. Todos os procedimentos que envolvam a manipulação de OGM classe de risco 3 devem ser conduzidos dentro de cabines de segurança biológica Classe II ou III. Deve existir autoclave para a descontaminação de resíduos, localizada no interior das instalações, com sistema de dupla porta e toda equipe técnica deverá tomar banho ao entrar e sair das instalações NB3. Além disso, deve ser usado uniforme completo específico nas instalações onde são manipulados OGM risco 3, sendo proibido o uso dessas roupas fora das instalações e obrigatório descontaminá-las antes de serem encaminhadas à lavanderia ou ao descarte.

Nível de Biossegurança 4 – NB4: é o nível de contenção que deve ser aplicado aos laboratórios onde são manipulados OGM da classe de risco 4. As instalações e procedimentos exigidos para o NB4 devem atender às especificações estabelecidas para o NB1, NB2 e NB3, além de outras especificidades, como a instalação de um sistema de contenção de NB4 no prédio e a presença de vigilância 24 horas por dia. As manipulações com OGM classe de risco 4 devem ser realizadas em cabine de segurança biológica Classe II ou III, em associação com roupas de proteção pessoal com pressão positiva, ventiladas por sistema de suporte de vida. Deve ser previsto um sistema de autoclave de dupla porta, câmara de fumigação, ou sistema de ventilação com antecâmara pressurizada para o fluxo de materiais para o interior do laboratório. Antes de acessar as instalações, a roupa comum deve ser trocada por roupa protetora completa e descartável. Antes de sair das instalações para a área de banho, a roupa

protetora deve ser deixada em área específica para descontaminação antes do descarte. Qualquer líquido efluente, antes de ser liberado das instalações, deve ser descontaminado por tratamento térmico. Em relação ao material biológico viável, se for necessária a sua remoção das cabines Classe II ou III ou das instalações NB4, estes devem ser acondicionados em recipientes de contenção inquebráveis e selados. O material de contenção por sua vez, deve ser acondicionado dentro de um segundo recipiente também inquebrável e selado que passe por um tanque de imersão contendo desinfetante ou por uma câmara de fumigação ou, ainda, por um sistema de barreira de ar.

Em geral, em todos os níveis de contenção é necessário que seja adotado um programa rotineiro de controle de insetos e roedores, além de ser disponibilizado a toda equipe um manual de biossegurança de acordo com as especificidades do laboratório e das atividades. Deve ocorrer a realização de registros de cada atividade desenvolvida com OGM e seus derivados e o uso de equipamentos de proteção individual como jalecos, luvas, gorros, máscaras, óculos, protetores pró-pé, entre outros, sendo que estes devem ser retirados antes de se deixar as instalações credenciadas.

6.5.3. Certificado de qualidade em biossegurança

Para a manipulação de OGM e derivados de qualquer risco em atividades de pesquisa é necessário a obtenção de um Certificado de Qualidade em Biossegurança (CQB), sendo este solicitado pelo CIBio e avaliado e emitido pelo CTNBio. As atividades permitidas englobam a construção, o cultivo, a manipulação, o transporte, a transferência, a importação, a exportação, o armazenamento, a liberação no meio ambiente e o descarte de OGM. O CQB também recebe a classificação de acordo o nível de biossegurança do OGM, portanto, sendo 1, 2, 3 e 4.

Revisão dos conceitos apresentados

- A engenharia genética é o conjunto de técnicas moleculares que permitem manipular os ácidos nucleicos para a obtenção de organismos geneticamente modificados visando a aplicação biotecnológica.
- A fita dupla de DNA é constituída por nucleotídeos e sua replicação é feita pela enzima DNA polimerase, dependente de uma fita-molde e de uma hidroxila na extremidade 3’ da pentose de uma das cadeias, o que é fornecido pelo *primer*.

- Na transcrição, a RNA polimerase inicia a síntese da fita simples de ribonucleotídeos a partir do reconhecimento de sequências específicas na região promotora.
- Em bactérias, existe apenas uma única RNA polimerase, e esta é composta por cinco subunidades ($\alpha2$, β, β′ ω), e um fator específico, denominado de fator δ, responsável pela especificidade e ligação a promotores distintos.
- Em eucariotos existem pelo menos três RNA polimerases nucleares além das encontradas nas mitocôndrias e/ou cloroplastos.
- Genes de manutenção celular são expressos constitutivamente, enquanto que, para os demais, a expressão tem de ser induzida ou reprimida por meio de proteínas regulatórias.
- A regulação negativa da expressão gênica ocorre pela interação do repressor ao operador, sequência próxima ao promotor, inibindo a interação da RNA polimerase holoenzima.
- Na regulação positiva da expressão gênica, o ativador possibilita que a RNA polimerase holoenzima se ligue ao DNA de forma mais eficiente.
- O operon *lac*, em que uma região promotora leva à expressão de três genes relacionados com o metabolismo de lactose, é um exemplo clássico tanto da regulação negativa, quanto da positiva. Na presença de glicose, fonte preferencial de carbono, a proteína repressora *LacI* liga-se ao operador e a interação da RNA polimerase é muito fraca (repressão catabólica). Já na ausência de glicose e presença de lactose, o metabólito alolactose interage com o repressor, propiciando sua alteração conformacional e o seu desligamento do operador. Além disso, o aumento de AMP cíclico propicia a interação da proteína ativadora de catabolismo, aumentando a interação da RNA polimerase para a expressão dos genes do operon, o que permitirá o uso da lactose como fonte de carbono (indução catabólica).
- Na engenharia genética, a manipulação genética se dá por meio da clonagem molecular, obtendo-se moléculas de DNA recombinante que são posteriormente introduzidas em um micro-organismo.
- A reação em cadeia da polimerase (PCR), eletroforese em gel de agarose e sequenciamento automático de DNA são técnicas frequentemente empregadas na obtenção e identificação de moléculas de DNA recombinante.
- Na tecnologia do DNA recombinante, o uso de promotores fortes visa aumentar a expressão de um gene de interesse.

- Expressão heteróloga é o termo utilizado para a expressão de um gene que não está naturalmente presente em um organismo.
- Por meio de engenharia metabólica, o micro-organismo hospedeiro pode ser modificado para disponibilizar em quantidades adequadas os metabólitos que são substratos do(s) gene(s) heterólogo(s) inserido(s).
- Organismos geneticamente modificados também podem ser obtidos por mutação utilizando diversas técnicas tais como: evolução adaptativa; uso de agentes mutagênicos; mutação sítio dirigida; PCR mutagênico, dentre outros.
- As mutações são eventos raros que podem ser definidos como alterações perpetuáveis no DNA de um organismo, sendo que, por esta definição, mutante seria qualquer indivíduo que sofreu este tipo de modificação.
- As mutações podem ser espontâneas como as tautoméricas ou podem ocorrer pela ação de agentes externos - os agentes mutagênicos.
- Os agentes mutagênicos podem causar alterações no DNA através de interações físicas, químicas ou biológicas ocasionando: (i) adição, remoção e/ou troca de nucleotídeos; (ii) alteração no pareamento das bases nitrogenadas; e (iii) alteração no quadro de leitura de uma sequência.
- No Brasil a CTNBio regulamenta normas de segurança e mecanismos de fiscalização a respeito da manipulação, contenção e descarte de organismos geneticamente modificados (OGM) e seus derivados. Estas diretrizes têm como objetivo estimular o avanço científico na área de biossegurança e biotecnologia, a proteção à vida e à saúde humana, animal e vegetal e a observância do princípio da precaução para a proteção do meio ambiente.
- Os critérios usados para a manipulação devem estar de acordo com a classe de risco do OGM, sendo este o que determinará o nível de biossegurança (NB) adotado para cada OGM específico. A instituição na qual se obterá e manipulará o OGM deve possuir um certificado de qualidade em biossegurança (CQB) específico de acordo com a classe de risco e NB.

Questões

1. Coloque entre parênteses: D para a característica que está envolvida no processo de replicação do DNA e R para a que faz parte do processo de transcrição e formação de mRNA:

( ) Fita simples de ribonucleotídeos.
( ) As bases nitrogenadas utilizadas na síntese são A, C, G e T.
( ) Fragmentos de Okazaki.
( ) O início da sua síntese é dependente de uma região promotora.
( ) Em eucariotos possui capacete de metil-guanidina e cauda de poli-adeninas.

2. Qual o papel das proteínas regulatórias na expressão gênica?
3. Levando em consideração o uso de lactose como fonte de carbono, como ocorre a repressão e a indução catabólica em *E. coli*?
4. Qual a importância dos mutantes na indústria?
5. Descreva os principais tipos de mutações.
6. Explique uma técnica para se obter um organismo geneticamente modificado.
7. Como são classificados os agentes mutagênicos? Descreva pelo menos um tipo de agente mutagênico de cada classe, explicitando sua forma de atuação.
8. Qual a vantagem do uso de um promotor forte para a expressão de um DNA recombinante?
9. A superexpressão em *Saccharomyces cerevisiae*, por tecnologia do DNA recombinante, do gene *PDR5*, que codifica uma proteína de membrana envolvida no transporte e detoxificação de diferentes moléculas nesta levedura, como o antifúngico fluconazol, é uma forma de expressão heteróloga? Explique.
10. Sabendo que em um organismo a frequência de mutação é de um erro para cada 10^6-10^7 nucleotídeos, calcule quantas mutações ocorrem naturalmente em um ciclo de replicação:
    a. Em um gene (em geral possui cerca de 1000 pb ou 1Kb).
    b. No genoma da bactéria *Escherichia coli* (aproximadamente 4,6 milhões de pb ou 4,6 Mb).
    c. No genoma da levedura *Saccharomyces cerevisiae* (aproximadamente 12,3 milhões de pb ou 12,3 Mb).
    d. No genoma do ser humano (aproximadamente 3,2 bilhões de pares de bases).
    e. Refaça os cálculos imaginando que a frequência de mutação é semelhante à de uma região *hotspot*.
11. Monte um fluxograma indicando as principais etapas para se obter um organismo geneticamente modificado. Assinale os pontos críticos (de maior complexidade técnica) para a aquisição dos mesmos.

12. Propor o desenvolvimento de um novo micro-organismo produtor de insulina ou hormônio do crescimento ou de qualquer outra proteína com aplicação biotecnólogica.
13. Um pesquisador deseja modificar geneticamente a bactéria *Staphylococcus aureus*, o objetivo é mutar alguns genes importantes para a formação de biofilme por esta bactéria. A estratégia de mutação será a inativação do gene pela introdução de um cassete de expressão com o gene *cat*, que codifica para a resistência ao antibiótico cloranfenicol. No entanto, a instituição em que o pesquisador trabalhará não tem CQB. Levando em conta o micro-organismo alvo do trabalho, o que a legislação preconiza previamente para que a Instituição possa trabalhar com *S. aureus* geneticamente modificado?
14. Diversos produtos foram originados/melhorados a partir das técnicas apresentadas neste capítulo – como por exemplo a penicilina. Pesquise outros produtos de interesse biotecnológico e analise as principais técnicas utilizadas para a obtenção e evolução deles.

Tópicos para discussão

- A tecnologia *Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats* (CRISPR) é capaz de modificar genes de um micro-organismo sem que seja possível, posteriormente, identificar se ele foi ou não modificado. Quais são os desafios e embates éticos sobre o uso deste tipo de tecnologia.
- De acordo com o artigo "Design and synthesis of a minimal bacterial genome" (Hutchison III, C.A. *et al*. Science, v. 351, n. 6280, 2016), foi possível modificar o material genético da bactéria *Mycoplasma mycoides* a fim de se obter o menor genoma com o menor número de genes. Os 473 genes presentes relacionam-se à sobrevivência e reprodução da bactéria, embora 149 destes ainda tenham função desconhecida.Após a leitura do artigo e deste capítulo, é importante levantar as seguintes discussões: 1) O que significa construir um micro-organismo com genoma mínimo? 2) Em termos de biologia molecular e engenharia genética, quais técnicas podem ser empregadas para a construção de um micro-organismo com genoma mínimo? 3) Industrialmente, qual(is) a(s) vantagem(ns) de trabalhar com uma célula com genoma mínimo? 4) Ética e evolutivamente, discuta até que ponto os avanços

na construção de um genoma mínimo não são uma extrapolação da Natureza?

Sugestões para pesquisa

- Uma das principais formas de obter e regular a expressão de proteínas em micro-organismos é por meio da escolha de promotores. Pesquise sobre promotores para procariotos e eucariotos que possam ser induzíveis, reguláveis ou constitutivos. Para isto, observe quais as possíveis implicações sobre o crescimento e viabilidade celulares e sobre os custos de produção industrial.
- Pesquise e liste quais produtos encontrados nos supermercados utilizam micro-organismos; e quais micro-organismos são encontrados neles.
- Pesquise micro-organismos que foram modificados geneticamente e que são utilizados na produção de produtos consumidos rotineiramente.

Referências

Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnol Adv*. 2013;31(6):877–902: ISSN: 1873-1899. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23624242.

Adrio JL, Demain AL. Fungal biotechnology. *Int Microbiol*. 2003;6(3):191–199: Sep. ISSN: 1139-6709. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12898399.

Ahmad M, et al. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(12):5301–5317: Jun. ISSN: 1432-0614. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24743983.

Akaraonye E, et al. Production of polyhydroxyalkanoates: the future green materials of choice. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 2015;85(6):732–743.

Alberts B, et al. *Molecular Biology of the Cell*. 5th ed New York: Garland Science; 2007.

Alberts B, et al. Biologia Molecular da Célula. *Artmed*. 2010: ISBN 8536321709.

BRASIL. Presidência da República. Lei 11.105, de 24 de março de 2005 – Disponível em: http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2005/lei/l11105.htm.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, CTNBio. Resolução Normativa 2, de 27 de novembro de 2006. Disponível em: http://www.ctnbio.gov.br/index.php/content/view/3913.html.

BRASIL. Ministério da Saúde. Classificação de Risco dos Agentes Biológicos – 2006. Disponível em : http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/06_1156_M.pdf.

Brown TA. *Gene cloning and DNA analysis: an introduction*. 6th ed West Sussex: Wiley-Blackwell; 2010: 338 p.

Caspeta L, et al. Altered sterol composition renders yeast thermotolerant. *Science*. 2014;346(6205):75–78: ISSN: 0036-8075.

Castelnuovo M, Stutz F. Role of chromatin, environmental changes and single cell heterogeneity in non-coding transcription and gene regulation. *Current Opinion in Cell Biology*. 2015;34:16–22: June. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.ceb.2015.04.011.

Celik E, Calik P. Production of recombinant proteins by yeast cells. *Biotechnol Adv*. 2012;30(5):1108–1118: Sep-Oct. ISSN: 1873-1899. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21964262.

Chen K, Rajewsky N. The evolution of gene regulation by transcription factors and microRNAs. *Nature Reviews Genetics*. 2007;8(2):93–103: ISSN: 1471-0056. Disponível em: http://www.nature.com/nrg/journal/v8/n2/full/nrg1990.html.

Cox, M.M. 2013. Lehninger Principles of Biochemistry, 6. W.H. Freeman, 1340. ISBN 978-1429234146.

Dieter Becker CB, Harry Brumer III, Marc Claeyssens, Christina Divne B, Richard Fagerstrom, Mark Harris T, Alwyn Jones, Gerard J. Kleywegt, Anu Koivula, Sabah Mahdi, Kathleen Piens, Michael L. Sinnott, Jerry Stahlberg, Tuula T. Teeri, Melanie Underwood, Gerd Wohlfahrt. Engineering of a glycosidase Family 7 cellobiohydrolase to more alkaline pH optimum: the pH behaviour of *Trichoderma reesei* Cel7A and its E223S/A224H/L225V/T226A/D262G mutant. *Biochemical Journal*. 2001;356:19–30.

Escovar-Kousen JM, Wilson D, Irwin D. Integration of computer modeling and initial studies of site-directed mutagenesis to improve cellulase activity on Cel9A from *Thermobifida fusca*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2004;113(1–3):287–297: ISSN: 0273-2289.

Ferrer-Miralles N, Villaverde A. Bacterial cell factories for recombinant protein production; expanding the catalogue. *Microb Cell Fact*. 2013;12:113: ISSN: 1475-2859. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24245806.

Frommer WB, Ninnemann O. Heterologous Expression of Genes in Bacterial, Fungal, Animal, and Plant Cells. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. 2003;46:419–444: Disponível em: http://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev.pp.46.060195.002223.

Gavrilescu M, Chisti Y. Biotechnology - a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances*. 2005;23(7–8):471–499: Disponível em: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975005000340.

Glick BR, Pasternak JJ, Patten CL. *Molecular Biotechnology – Principles and Applications of Recombinant DNA. 4*. ASM Press; 2009: ISBN 9781555814984.

González-Blasco G, et al. Directed evolution of β-glucosidase A from *Paenibacillus polymyxa* to thermal resistance. *Journal of Biological Chemistry*. 2000;275(18):13708–13712: ISSN: 0021-9258.

Griffiths A, et al. *Introdução à Genética*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.

Hermann T. Industrial production of amino acids by coryneform bacteria. *J Biotechnol*. 2003;104(1–3):155–172: Sep. ISSN: 0168-1656. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12948636.

Hutchison CA, et al. Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. *Journal of Biological Chemistry*. 1978;253(18):6551–6560: ISSN: 0021-9258.

Jia X, et al. Use of an EZ-Tn5-based random mutagenesis system to create a *Zymomonas mobilis* with significant tolerance to heat stress and malnutrition. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*. 2013;40(8):811–822: ISSN: 1367-5435.

Jang YS, et al. Butanol production from renewable biomass: rediscovery of metabolic pathways and metabolic engineering. *Biotechnol J*. 2012;7(2):186–198: Feb. ISSN: 1860-7314. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21818859.

Johns AT. The production of propionic acid by decarboxylation of succinic acid in a bacterial fermentation. *Biochem J*. 1948;42(1):ii: ISSN: 0264-6021. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18934530.

Jullesson D, et al. Impact of synthetic biology and metabolic engineering on industrial production of fine chemicals. *Biotechnol Adv*. 2015: Feb. ISSN: 1873-99. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25728067.

Krivoruchko A, Nielsen J. Production of natural products through metabolic engineering of Saccharomyces cerevisiae. *Curr Opin Biotechnol*. 2014;35C:7–15: Dec. ISSN: 1879-0429. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25544013.

Lewin B, et al. *Lewin's Genes XI*. Jones & Bartlett Publishers; 2014: ISBN: 1449659055.

Lewis MA. Tale of Two Repressors. *Journal of Molecular Biology*. 2011;409(1):14–27: 27 May. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.jmb.2011.02.023.

Madigan, M.T. et al. 2014. Brock Biology of Microorganisms. Benjamin Cummings, 1032 p.

Mccarthy JK, et al. Improved catalytic efficiency and active site modification of 1, 4-β-D-glucan glucohydrolase A from *Thermotoga neapolitana* by directed evolution. *Journal of Biological Chemistry*. 2004;279(12):11495–11502: ISSN: 0021-9258.

Macauley-Patrick S, et al. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. *Yeast*. 2005;22(4):249–270: Mar. ISSN: 0749-503X. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15704221.

N Glazer, A., Nikaido, H. 2007. Microbial Biotechnology: Fundamentals of Applied Microbiology. 2. Cambridge University. ISBN: 0521842107.

Ongley SE, et al. Recent advances in the heterologous expression of microbial natural product biosynthetic pathways. *Nat Prod Rep*. 2013;30(8):1121–1138: Aug. ISSN: 1460-4752. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23832108.

Passarge, E. 2007. Color Atlas of Genetics. Thieme. ISBN: 1588903362.

Peralta-Yahya PP, et al. Microbial engineering for the production of advanced biofuels. *Nature*. 2012;488(7411):320–328: Aug. ISSN: 1476-4687. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22895337.

Punt PJ, et al. Filamentous fungi as cell factories for heterologous protein production. *Trends Biotechnol*. 2002;20(5):200–206: May. ISSN: 0167-7799. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11943375.

Rignall TR, et al. Effect of single active-site cleft mutation on product specificity in a thermostable bacterial cellulase. *Biotechnology for Fuels and Chemicals*. Springer; 2002:383–394: ISBN: 1461266211.

Sims J. Assessment of biotechnology products for therapeutic use. *Toxicol Lett*. 2001;120(1–3):59–66: Mar. ISSN: 0378-4274. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11323162.

Song H, Lee SY. Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006;39(3):352–361: 3 July. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.11.043.

Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006;72(2):211–222: Sep. ISSN: 0175-7598. Disponível em: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16791589.

Turner AP, et al. The incorporation of epigenetics in artificial gene regulatory networks. *Biosystems*. 2013;112(2):56–62: May. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystems.2013.03.013.

Waites MJ, et al. *Industrial Microbiology: an Introduction*. John Wiley & Sons; 2009: ISBN: 1444311581.

Watson JD, et al. *Molecular Biology of the Gene*. San Francisco: Pearson/Benjamin Cummings; 2008: ISBN: 080539592X.

Zaha, A., Ferreira, H.B., Passaglia, L.M. 2014. Biologia Molecular Básica. Artmed. ISBN: 8582710585.

Zhang B, et al. Inverse metabolic engineering of *Bacillus subtilis* for xylose utilization based on adaptive evolution and whole-genome sequencing. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2015;99(2):885–896: ISSN: 0175-7598.

Zhang H, et al. Methods and options for the heterologous production of complex natural products. *Nat Prod Rep*. 2011;28(1):125–151: Jan. ISSN: 1460-4752. Disponível em:

http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21060956.

CAPÍTULO

7

Métodos de Esterilização e Desinfecção em Bioprocessos

Ariane Gaspar Santos

Carlos Eduardo Conceição de Souza

Bernardo Dias Ribeiro

Conceitos apresentados neste capítulo

Neste capítulo são apresentados conceitos básicos sobre métodos de esterilização e desinfecção, abrangendo os principais métodos físicos e químicos utilizados na microbiologia e também apresentando alguns mais recentes. O enfoque é dado no modo de ação, aplicabilidade e importância desses métodos dentro da microbiologia em bioprocessos. A avaliação da atividade antimicrobiana de desinfetantes e antissépticos é abordada por meio de métodos que descrevem esses procedimentos de forma detalhada em esquemas, de acordo com a legislação brasileira e regulamentações internacionais. Dessa maneira, o capítulo dedica-se a introduzir o leitor nos principais conceitos sobre controle microbiano, evidenciando diferentes estratégias e alternativas para realizá-lo, assim como demonstrar procedimentos para a avaliação de agentes desinfetantes e antissépticos utilizados para atingir tal finalidade.

7.1. Definição

Desde 1864, quando Louis Pasteur desacreditou a teoria de geração espontânea utilizando calor para eliminar contaminantes em seu frasco com meio de cultivo (Madigan *et al.*, 2012), a esterilização e a desinfecção se tornaram assuntos importantes para controle de crescimento, ou até a eliminação de micro-organismos. Normalmente este tema está mais associado às áreas médica e farmacêutica, mas tem grande interesse para a indústria de bioprocessos.

Uma das definições mais utilizadas vem da Guia para Desinfecção e Esterilização em Estabelecimentos de Saúde (Rutala *et al.*, 2008) criada pelo Centro de Prevenção e Controle de Doenças dos Estados Unidos, segundo o qual:

1. **Esterilização**: processo que destrói ou elimina todas as formas de vida microbiana.
2. **Desinfecção**: processo que elimina muitos ou todos os micro-organismos patogênicos, exceto esporos bacterianos, em objetos inanimados. Se for aplicado a tecidos vivos como pele, o termo correto é **Antissepsia.**
3. **Limpeza ou Sanitização:** remoção de sujidades (materiais orgânicos e inorgânicos) de objetos e superfícies através do uso, manual ou mecânico, de água com detergentes ou produtos enzimáticos. Já a **Descontaminação** é referente à remoção de micro-organismos patogênicos de objetos a níveis seguros de manipulação, uso ou descarte.

No Brasil, há a Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n. 17, 16/04/2010 que normatiza as Boas Práticas de Fabricação de Medicamentos (ANVISA, 2010), informando quando se deve utilizar os métodos de esterilização, complementado pelo RDC n. 15, 15/03/2012 (ANVISA, 2012).

7.1.1. Fatores importantes na esterilização

A eficiência na eliminação dos micro-organismos irá depender de alguns fatores, além do método utilizado:

1. **Tamanho da carga microbiana**, quer dizer, o número de células viáveis iniciais.
2. **Características intrínsecas microbianas**, por exemplo, as paredes celulares de bactérias e fungos são bem distintas.
3. **Tempo de exposição** ao agente microbiocida.

4. **Temperatura** na qual os micro-organismos são expostos ao agente microbiocida.
5. **Concentração ou intensidade do agente microbiocida.**
6. **Natureza do material** contendo os micro-organismos.
7. **Condições ambientais,** por exemplo, pH e matéria orgânica.

O tamanho da carga microbiana e suas características, o tempo e a temperatura de exposição da metodologia de esterilização são fatores que podem ser correlacionados matematicamente pelas equações:

$$-\frac{dn}{dt} = k_d n \qquad \textbf{(1)}$$

$$k_d = k_{d0} exp\left({}^{-E_a}\!\big/_{RT}\right) \qquad \textbf{(2)}$$

$$ln\left(\frac{n}{n_0}\right) = -k_{d0}\int_0^t exp\left({}^{-E_a}\!\big/_{RT}\right)dt,\text{, sendo que } t = t_f,\ n = n_f = ,001 \qquad \textbf{(3)}$$

Nas Equações 1, 2 e 3, **n** significa o número de células microbianas, $\mathbf{k_d}$ representa a taxa de inativação ou morte térmica, **t** é o tempo de exposição, $\mathbf{k_{d0}}$ é a constante de Arrhenius, $\mathbf{E_a}$ é a energia de inativação do referido micro-organismo (característica intrínseca), **R** representa a constante universal de gases ideais (8,3145 $J.K^{-1}.mol^{-1}$), **T** a temperatura de exposição.

A condição na equação (3) é uma hipótese matemática necessária porque, se n_f for igual a zero, o tempo necessário para realizar a esterilização seria infinito, por isso que a cada 1000 esterilizações, 1 célula microbiana se manteria viável, e assim considerou-se n_f um valor pequeno (0,001) mas diferente de zero.

Para cada metodologia, há uma correlação entre tempo e temperatura, demonstrando como ocorre a transferência de calor. Como exemplo, a Equação (4) se refere ao método de esterilização de calor úmido,

aspergindo vapor pelo meio de cultivo e o fermentador, onde $\mathbf{T_0}$ é a temperatura inicial do meio, $\mathbf{c_p}$ é a capacidade calorífica do meio, **M** é a massa inicial do meio, $\mathbf{m_s}$ é taxa mássica de entrada do vapor, **H** é a diferença entre entalpias do vapor saturado e o meio na temperatura inicial.

$$T = T_0 + \frac{Hm_s t}{c_p \left(M + m_s t\right)} \qquad \textbf{(4)}$$

Neste caso, a intensidade do agente microbiocida (vapor saturado) também está presente na equação (4) na forma de m_s. Cada meio utilizado para crescimento microbiano terá uma capacidade calorifica diferente e deverá ser calculado previamente, para estimativas mais precisas. Se o micro-organismos estiver em superfícies de materiais metálicos, poliméricos ou de vidro, deverão ser calculados os coeficientes de transferência de calor para cada um, o que também influenciará no k_d. Outro ponto é a presença de matéria orgânica ou partículas em suspensão no meio que podem atrapalhar a transferência de calor durante o método, aumentando o tempo necessário para a esterilização. Para maiores informações sobre equações envolvendo esterilização, há as referências Katoh *et al.* (2015), Dutta (2008), Schmidell *et al.* (2001), Stanbury *et al.* (1995) e Raju e Cooney (1993).

7.2. Métodos físicos

Métodos físicos para o controle microbiológico estão amplamente difundidos e são tradicionalmente utilizados em diversas áreas. Podemos destacar como os mais relevantes o calor seco e úmido, a filtração e as radiações.

Medidas de controle do crescimento microbiano possuem ampla utilidade em diversos campos distintos, como na medicina, odontologia, biologia, nutrição e farmácia, por exemplo. Essas medidas asseguram a prevenção de infecções hospitalares e a contaminação de manipuladores por patógenos, e garantem também a realização de pesquisas científicas sem a interferência de micro-organismos contaminantes por meio da esterilização de vidrarias e outros utensílios, a redução da carga microbiana no preparo e processamento de alimentos, assim como a qualidade de fármacos que devem estar isentos de carga microbiana.

Esses métodos, no entanto, não se restrigem apenas a essas áreas e envolvem inúmeras aplicações práticas dentro de toda a microbiologia, inclusive na área de bioprocessos. A utilização correta e adequada dos métodos de controle garante a qualidade do produto final e pode estar presente em diferentes etapas do seu processamento, assegurando a carga adequada de micro-organismos sem inviabilizá-lo. Dessa maneira, por exemplo, é possível evitar grandes perdas econômicas dentro de uma indústria que realiza fermentação etanólica ao reduzir a carga microbiana das matérias-primas, assim como evitar que biofármacos que serão administrados em seres vivos sofram algum tipo contaminação ao longo do seu processo produtivo, atendendo a compromissos de regulação e requisitos de conformidade (Madigan, Martinko e Parker, 2004; Vermelho, 2006; Trabulsi e Alterthum, 2008; Ward, 2012).

7.2.1. Calor úmido

A utilização do calor como método de controle biológico pode ser considerada a técnica mais antiga e amplamente empregada para tal finalidade, e estipula-se que já na época do império romano a esterilização pelo calor era utilizada para tratar instrumentos médicos. Por ser uma técnica simples e de alta eficiência, seu uso é explorado até os dias de hoje. É importante observar que existem dois tipos de calor, o úmido e o seco, e que cada um desses métodos deve ser utilizado de maneira apropriada para cada objetivo específico, como por exemplo: o micro-organismo alvo

a ser atingido e o tipo de produto ou material que sofrerá a ação do calor. Este tópico tratará primeiramente sobre o calor úmido, mostrando suas propriedades, objetivos e modo de ação (Rogers, 2012).

A esterilização pelo calor úmido consiste na formação de vapor d'água sobre pressão que irá atuar diretamente nas células de fungos e bactérias durante um determinado período de tempo, promovendo a fluidificação dos lipídios e a desnaturação de proteínas estruturais e enzimas, levando consequentemente à morte celular, uma vez que a capacidade funcional das macromoléculas passará a ser afetada. Devido ao grande poder de penetração do vapor d'água, esse método possui alta eficiência microbicida, sendo altamente recomendado também pelo seu baixo custo, por ser atóxico e possuir rápido poder de destruição celular. Em contrapartida, apenas materiais resistentes ao calor e à água podem sofrer esse tipo de tratamento (por exemplo, metais em sua maioria, vidros, líquidos, alguns polímeros, medicamentos, etc). É de grande importância ressaltar que o calor aplicado durante esse processo deve possuir a capacidade de matar as formas microbianas mais resistentes, como os endoesporos bacterianos, mesmo que o objeto a ser esterilizado não possua essa carga microbiana (Trabulsi e Alterthum, 2008; Rutala e Weber, 2008).

Endoesporos bacterianos e príons (proteínas infecciosas) são altamente resistentes ao calor e sua inativação só é possível sob altas temperaturas. Vários ciclos padrão para esterilização são utilizados (por exemplo, 115°C por 30 min, 121°C por 15 min, 134°C por 3min), e não há, necessariamente, equivalência entre eles, no entanto, o ciclo mais comum é o de 121°C por 15 min, capaz de inativar formas vegetativas de fungos e bactérias e também $1x10^{-8}$ UFC de *Bacillus stearothermophilus.* Para a inativação de príons um ciclo mais severo é necessário, onde é aplicada uma temperatura de 132°C durante 1 hora. Não há diferença de aminoácidos entre o príon não infeccioso para o infeccioso, contudo, a disponibilidade espacial de aminoácidos do príon infeccioso acaba conferindo a alta resistência dessa proteína. Os endoesporos bacterianos são uma forma de resistência que algumas bactérias conseguem manifestar durante condições ambientais estressantes para o seu desenvolvimento e, consequentemente, conseguem em condições adversas uma sobrevida muito maior que as células vegetativas. A grande resistência ao calor por essas estruturas está associada principalmente ao alto nível de desidratação gerado devido ao aumento na concentração de Ca^{++}, Mg^{++} e Mn^{++}, de pequenas proteínas ácido solúveis de esporo (PPASs) e de ácido dipicolínico, ocasionando a redução do protoplasto e formação de um gel.

Esporos com menor concentração PPASs e maior conteúdo de água tendem a ser menos resistentes ao calor (Madigan, Martinko e Parker, 2004; Roberts, 2013).

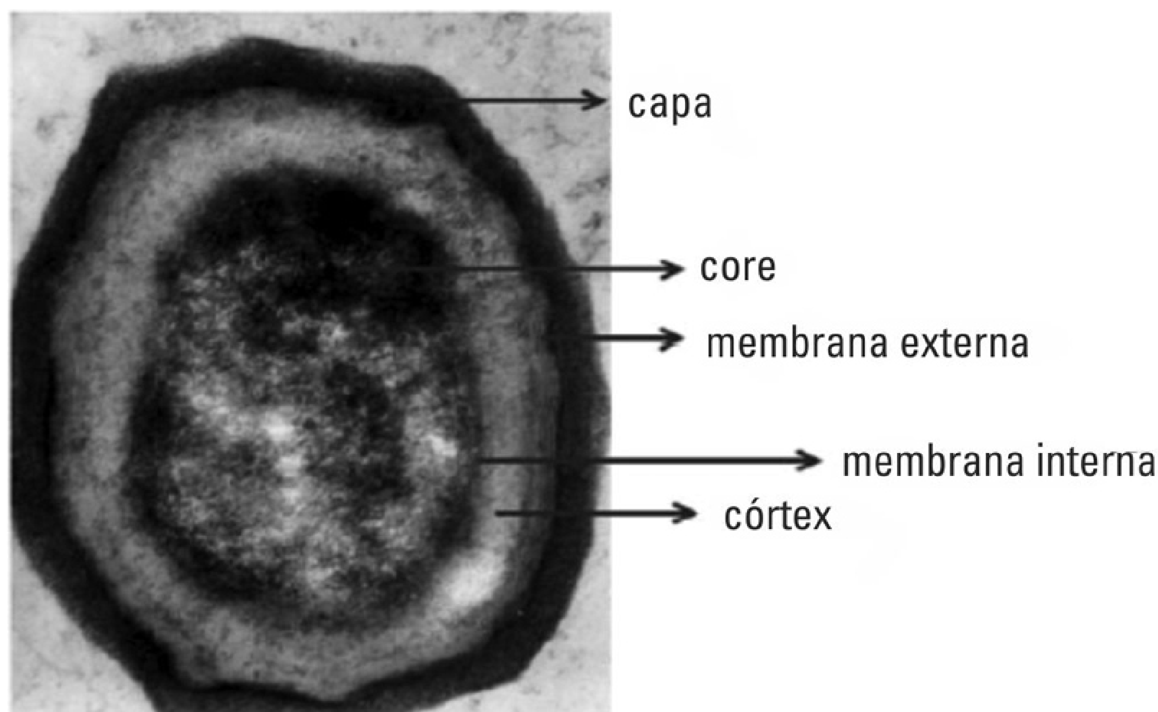


FIGURA 7.1 Micrografia eletrônica de transmissão de um endoesporo de Bacillus atrophaeus. *Fonte*: Adaptado de Sella, Vandenberghe e Soccol (2014).

Para a obtenção do calor úmido, um dos principais equipamentos utilizados é a autoclave. Esse dispositivo consegue atingir temperaturas acima da fervura da água devido ao seu sistema de aquecimento, vedação e manutenção da pressão de vapor interna.

Existem diferentes tipos de autoclave, proporcionando dessa maneira modos alternativos de autoclavagem que possuem variações em alguns detalhes. Em equipamentos que realizam a esterilização por gravidade, o vapor entra pela parte superior e força a saída do ar, que é mais pesado, pela parte inferior da câmara, ocasionando o aquecimento da carga de fora para dentro. Esse método é considerado demorado e é indicado para processar água, meios de cultura, produtos farmacêuticos e outros materiais que o vapor consiga contato direto com a superfície, não sendo muito indicado para produtos porosos que ainda possam aprisionar ar e dificultar o seu poder de penetração. Outro tipo de autoclavagem é a por

autovácuo, onde existe uma bomba que facilita a retirada do ar e a entrada do vapor d'água, reduzindo o tempo de esterilização.

O uso do vácuo está presente também na esterilização por vácuo-pulsátil, que possui grande eficiência e agilidade. Esse método consiste na injeção e retirada de vapor na autoclave de forma intermitente, permitido a rápida extração do ar e o aumento da temperatura interna, ocorrendo ao final do processo a eliminação do vapor e consequente secagem do material. Todos esses métodos empregam o vapor saturado seco, ou seja, apenas o vapor d'água está presente dentro da câmara. O vapor saturado úmido ou também chamado de condensado é outro estado físico de vapor utilizado, onde ainda existe excesso de água líquida dentro da câmara de autoclavação, essa característica o transforma em um método menos eficiente do que aqueles que aplicam o vapor saturado seco (Brasil, 2001; Rutala e Weber, 2008).

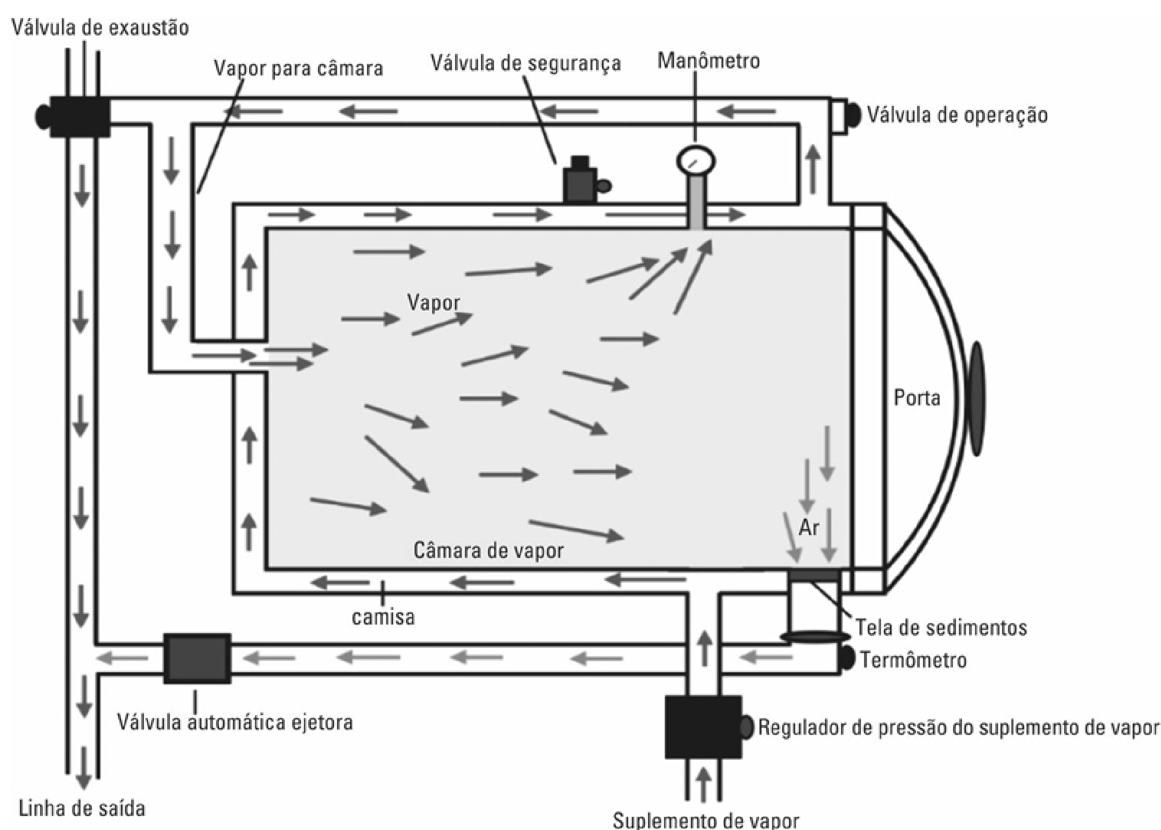


FIGURA 7.2 Modelo de funcionamento de autoclave gravitacional por vapor saturado seco.



FIGURA 7.3 Autoclave vertical comumente utilizada em laboratórios de microbiologia *Fonte*: Imagem cedida pelo laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Escola de Química da UFRJ.

Cada tipo de micro-organismo possui características intrínsecas que lhes conferem resistência diferente ao calor. Para avaliar essa resistência são utilizados 3 parâmetros, todos aplicados em práticas de esterilização tanto na indústria como em hospitais e laboratórios clínicos. O primeiro é denominado ponto de morte térmica (PMT), que avalia a menor temperatura aplicada em um período de 10 minutos a uma carga microbiana em suspensão para inativá-la totalmente. Outro critério de avaliação é o tempo de morte térmica (TMT), que consiste no período mínimo de tempo que todos os micro-organismos estarão mortos a uma determinada temperatura. Por meio desta técnica é possível medir a resistência ao calor de um micro-organismo, e confrontar sua sensibilidade com outros tipos de células desde que estas estejam padronizadas pelo mesmo tamanho populacional. Por último, um terceiro parâmetro chamado de tempo de redução decimal (D), que mede a resistência de um micro-organismo ao calor (seco ou úmido) é também empregado. Ele está relacionado com o tempo em minutos que se obtém apenas 10% de uma população viável a uma determinada temperatura. Quando se submete uma população microbiana a uma determinada temperatura sua inativação não ocorre de maneira linear, mas sim em escala logarítmica de primeira ordem de acordo com a Figura 7.4. Isso quer dizer que sob as mesmas condições de temperatura, será necessário o mesmo período de tempo para a redução de 1log daquela carga microbiana, independente de sua concentração, e que, se aumentada a temperatura, esse tempo tende diminuir devido à menor resistência do micro-organismo à condição imposta. A partir dessas análises, consequências práticas podem ser geradas, como a adaptação de um conjunto de condições (tempo e temperatura) para conseguir uma redução de uma população microbiana inicial a níveis de esterilidade em determinado produto ou artigo que seja limitado a uma certa temperatura de exposição. Um material é considerado estéril quando se trabalha em um nível de garantia de segurança de 10^{-6} de probabilidade de encontrar alguma célula microbiana viável (Trabulsi e Alterthum, 2008; Madigan, Martinko e Parker, 2004; Lerouge, 2012).

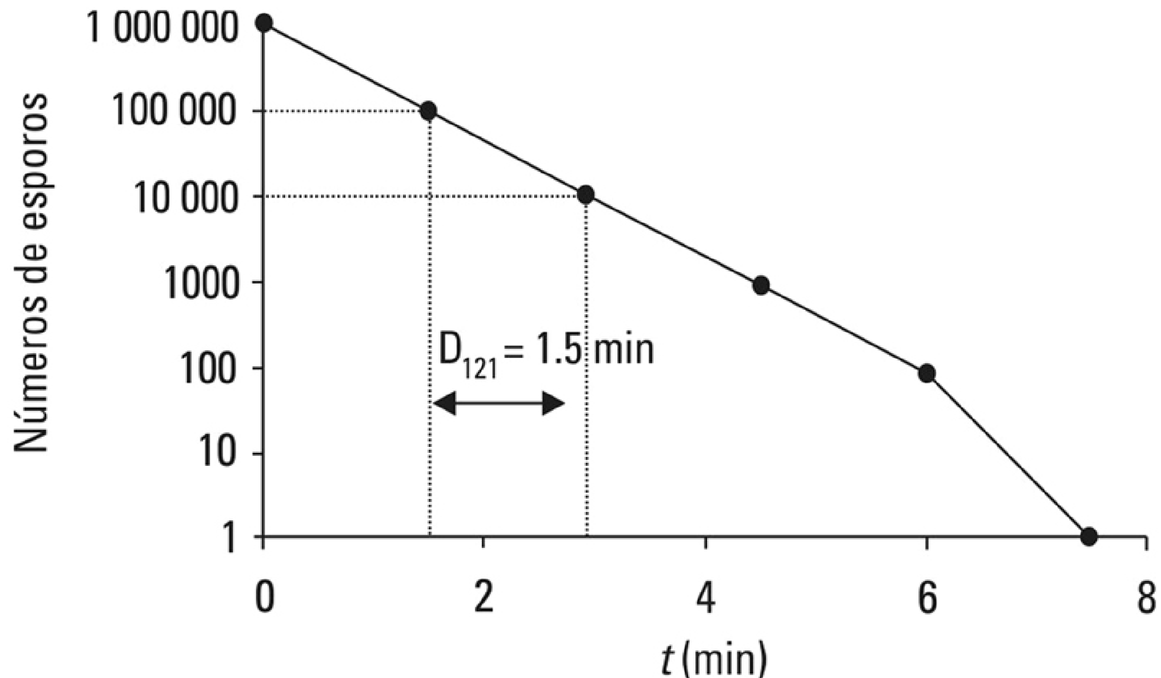


FIGURA 7.4 Efeito da temperatura na inativação de células microbianas. *Fonte*: Adaptado de Sterilisation of biomaterials and medical devices (2012).

7.2.2. Calor seco

O calor seco é um método simples e comumente utilizado para a redução de carga microbiana em artigos e superfícies. É uma alternativa ao calor úmido, sendo utilizado em materiais sensíveis e que podem ser danificados pela água, em processos que o uso do vapor precisa ser evitado ou em superfícies impenetráveis por ele. Materiais como óleos, graxas, pós, produtos derivados do petróleo e objetos afiados são exemplos de artigos que possuem preferência pela utilização desse método. Comparativamente ao calor úmido, o calor seco possui menor capacidade de penetração e portanto é menos eficiente. Seu modo de ação consiste na inativação das células por meio da desidratação e oxidação de seus constituintes químicos e possui vantagem por não ser um método tóxico e agressivo ao meio ambiente, uma vez que não faz uso de agentes químicos. Além disso, outra característica desse método é sua ação de despirogenização capaz de inativar toxinas e também enzimas como as RNases, possuindo grande valor dentro do setor de produção de biofármacos por exemplo. Por ser um método com menor capacidade de penetração, os ciclos de esterilização são programados com temperaturas e tempos superiores aos de uma autoclavação, podendo variar em ciclos de

60 minutos a 270°C, 120 minutos a 160°C e 150°C por 150 minutos de acordo com relatos da literatura. A esterilização por calor seco é realizada em estufas, que podem empregar um sistema de aquecimento onde o ar quente pode permanecer estático ou então ser forçado por meio de um ventilador que o distribuirá de forma mais homogênea, permitindo uma transferência de calor mais rápida, resultando em um ciclo de esterilização mais rápido e eficiente.

Além de fornos e estufas, dentro da microbiologia o calor seco é também utilizado na flambagem (300-600°C) de alças bacteriológicas em fogo até se atingir a cor rubra, promovendo a combustão completa dos micro-organismos, assim como na incineração (>1000°C) de artigos e animais de origem laboratorial contaminados e material hospitalar de uso descartável, promovendo sua descontaminação e eliminação (Sandle, 2013; Rutala e Weber, 2008; Roberts, 2013).



FIGURA 7.5 Forno utilizado para esterilizar artigos por calor seco. *Fonte*: Foto cedida pelo laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Escola de Química da UFRJ.

O fogo é um aliado da microbiologia dos tempos passados até os atuais e seu uso como calor seco não fica restrito somente à incineração de artigos contaminados. O uso de técnicas asssépticas é também essencial para se evitar a contaminação proveniente do ambiente externo (e do próprio manipulador que trabalha com microbiologia) sobre os artigos utilizados. Portanto, muitos procedimentos dentro dessa área são realizados próximos de uma zona com chama controlada proveniente do bico de Bunsen (zona de segurança) (Figura 7.6). A chama fornece um ambiente propício para a manipulação de material estéril ou a ser inoculado, uma vez que diminui a carga microbiana externa no ambiente de trabalho por meio do calor gerado. O bico de Bunsen oferece uma regulagem para controle da chama, e em microbiologia a ideal para se trabalhar consiste na chama azul, uma vez que se evita a formação de fuligem e alcança-se uma maior temperatura. A chama também é dividida em 3 zonas diferentes, chamadas: Zona neutra (onde não ocorre a combustão), redutora (começo da combustão do gás) e oxidante (combustão completa do gás, zona com maior temperatura) (Figura 7.7). É importante ressaltar que a flambagem de alças microbiológicas ocorre na zona oxidante pois garante a eliminação total dos micro-organismos.

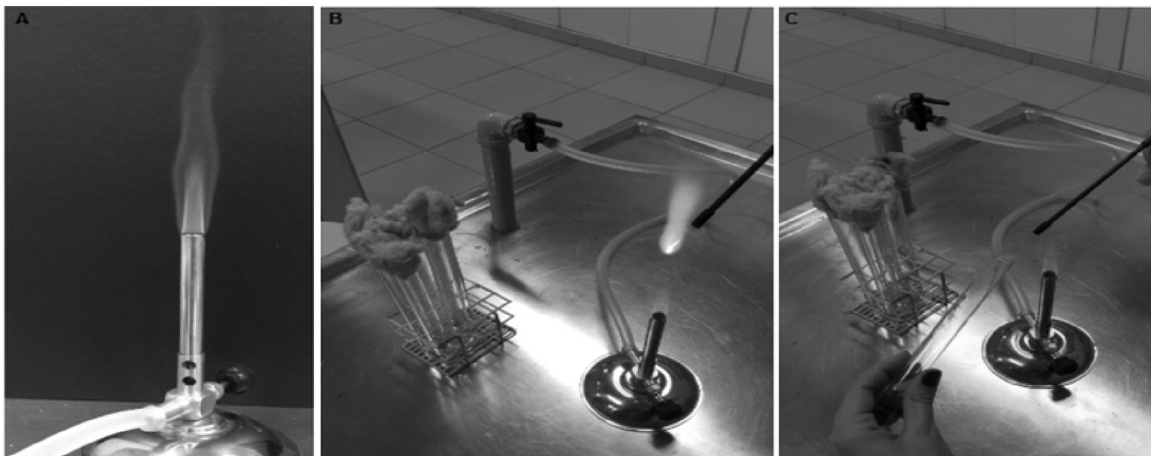


FIGURA 7.6 **A. Bico de Bunsen. B. Flambagem de alça bacteriológica até se atingir o rubro. C. Esquema de trabalho em Bico de Bunsen dentro da zona de segurança proporcionada pela chama.**

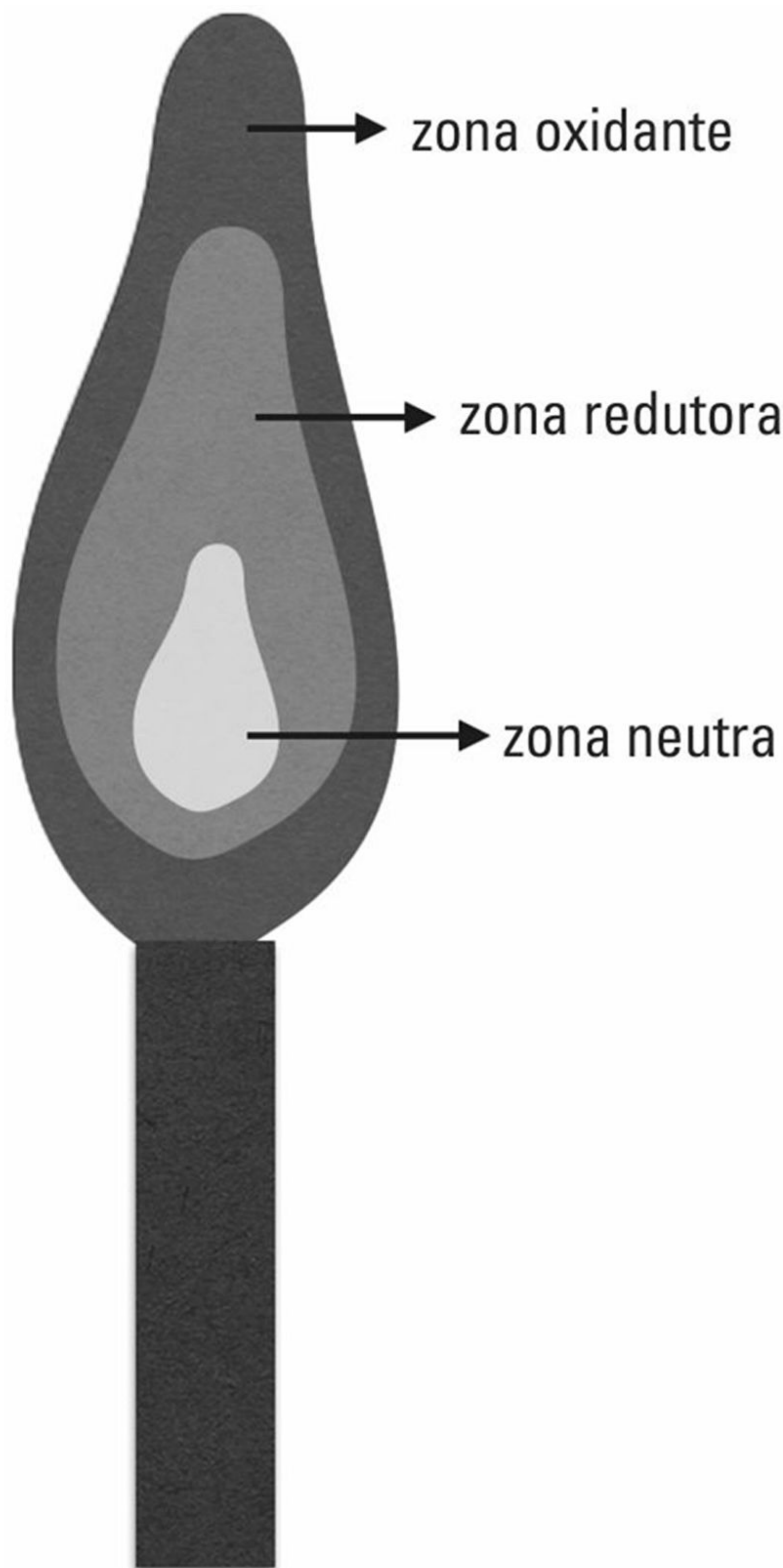


FIGURA 7.7 **Bico de Bunsen evidenciando as 3 divisões da chama.**

Com a evolução da microbiologia, novos dispositivos foram desenvolvidos para se conseguir um ambiente asséptico sem o uso do fogo, permitindo uma zona de trabalho mais ampla, confortável e eficiente. Isso foi possibilitado por meio do uso de câmaras de fluxo laminar que possuem um sistema de filtração de ar por membranas, como ainda será comentado no item 7.2.5.

7.2.3. Pasteurização

O processo de pasteurização foi primeiramente utilizado por Louis Pasteur para controlar a carga microbiana degradadora de vinho utilizando o calor. Este processo de maneira geral não pode ser comparado ao de esterilização, uma vez que não é capaz de eliminar esporos bacterianos e alguns vírus como o da hepatite A e outros parvovírus nas temperaturas comumente utilizadas. A pasteurização possui como principal função reduzir a carga microbiana de produtos líquidos, eliminando patógenos, bactérias e leveduras degradadoras, sendo portanto bastante empregada na indústria de bebidas e alimentos, para estender seu tempo de prateleira. Este método consiste em aquecer o produto até uma determinada temperatura e resfriá-lo em seguida, proporcionando um choque térmico na matriz, mas tomando cuidado para não desnaturar nenhum nutriente ou composto de importância. É importante ressaltar que o leite produzido em larga escala é esterilizado por meio desta técnica, onde ocorre a elevação da temperatura de forma rápida até 140°C durante alguns segundos e em seguida uma refrigeração imediata (Madigan, Martinko e Parker, 2004; Sandle, 2013; Trabulsi e Alterthum, 2008).

7.2.4. Radiação

A esterilização ou redução da carga microbiana utilizando a radiação é uma maneira eficiente de controlar o crescimento de micro-organismos e pode ser utilizada em diversos materiais e etapas de um bioprocesso. Primeiramente, é importante ressaltar que existem diversos tipos de radiação que atuam por meio de mecanismos específicos e são classificadas como não ionizantes e ionizantes.

Radiações não ionizantes possuem comprimento de onda maior que as ionizantes, um exemplo clássico é a luz ultra-violeta (UV), que possui comprimento entre 328 nm e 210 nm (3280 A até 2100 A). Seu maior poder de ação encontra-se no espectro de 240-280 nm, sendo capaz de inativar vírus e outros micro-organismos. Seu uso pode ser direcionado para a desinfecção de água, vacinas e produtos médicos, como para implantes de

platina e lentes de contato, no entanto sua eficiência é comprometida pelo seu baixo poder de penetração, possuindo maior eficiência em superfícies expostas. Para uma desinfecção efetiva da água por exemplo, esta deve passar pela luz UV de forma lenta e com um fluxo de baixa espessura para facilitar sua ação. No entanto, o uso de fontes de luz visível/UV de alta intensidade tem sido feito para esterilizar produtos farmacêuticos como água e salina, porém seu uso fica limitado em bioprodutos mais complexos. O que faz da luz UV um agente de controle microbiano é seu poder mutagênico no DNA, levando à formação de ligações cruzadas entre pirimidinas adjacentes, com consequente formação de dímeros de timina impedindo a ação da DNA polimerase (Figura 7.8).

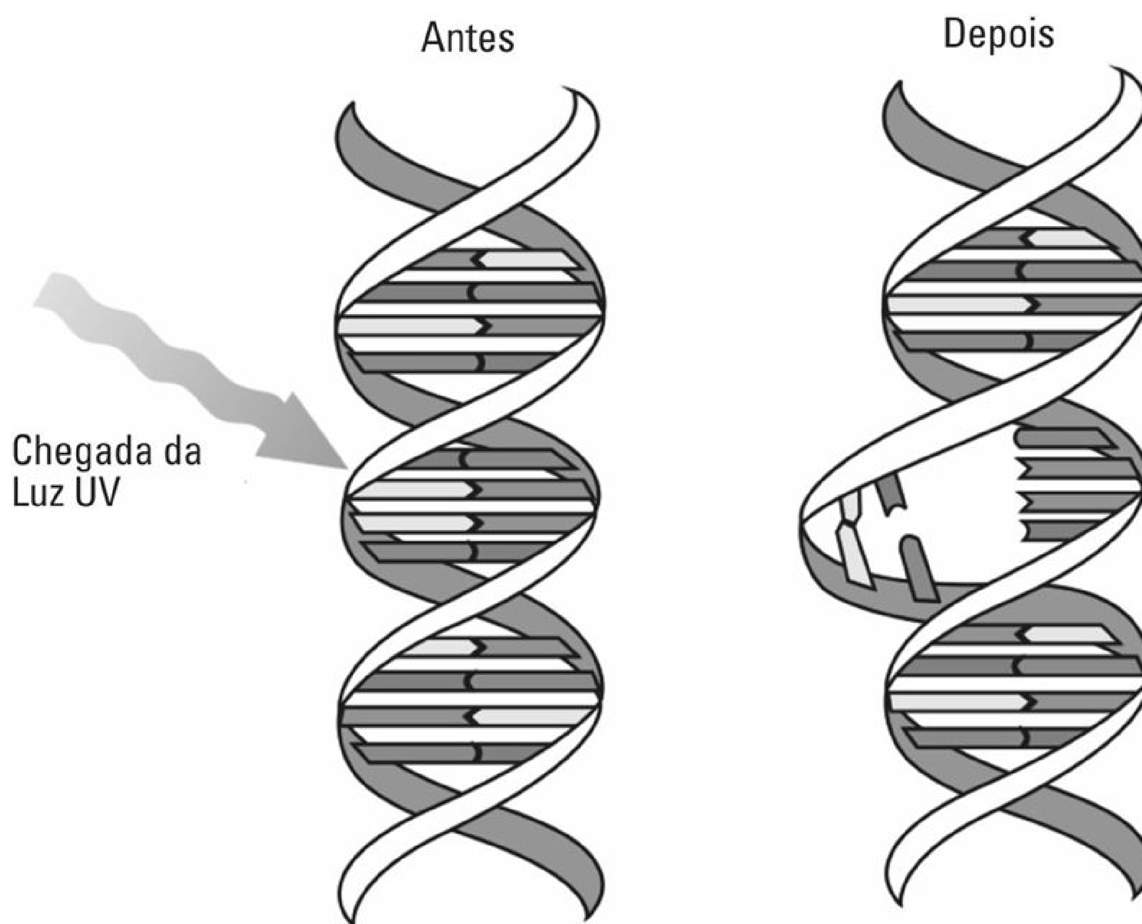


FIGURA 7.8 Mutação fotoquímica gerada pela luz UV resultando formação de dímeros de timina. *Fonte*: Adaptado de Ultrasound Technologies for Food and Bioprocessing.

Células vegetativas e vírus são mais sensíveis a esse tipo de radiação do que esporos bacterianos e príons (Vermelho, 2006; Roberts, 2013; Mancosky e Milly, 2011). Em procedimentos assépticos na microbiologia, a luz UV é combinada a um sistema de filtração de ar presente em câmaras de fluxo laminar (Figura 7.9) para criar um ambiente livre de microorganismos contaminantes, sendo esta ligada durante aproximadamente 30 minutos antes de qualquer manuseio a ser realizado no interior do equipamento.



FIGURA 7.9 Câmara de fluxo laminar utilizado na microbiologia com a luz ultra- violeta em funcionamento em uma etapa de pré-utilização do equipamento. *Fonte*: Imagem cedida pelo laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Escola de Química da UFRJ.

Radiações ionizantes como os raios-X e os raios-gama possuem comprimento de onda muito baixo, o que lhes conferem um alto poder de penetração em objetos, sendo portanto mais eficientes que a luz UV como agente descontaminante e esterilizante. Os raios gama se popularizaram na década de 80 como uma alternativa mais ecológica e menos tóxica que o óxido de etileno para fins de esterilização. Geralmente são utilizados para esterilizar frascos de cultura de células, filtros, seringas, antibióticos e materiais sensíveis ao calor. Esse tipo de radiação eletromagnética atua fazendo a retirada de íons das moléculas com as quais as partículas radioativas colidem, formando, dessa maneira, radicais livres a partir da água (hidroxil e híbrido) que irão reagir com as moléculas do meio intracelular de forma danosa, degradando proteínas e biopolímeros como a molécula de DNA, que também é atingida diretamente pela radiação que promove sua quebra. Portanto, se a energia da partícula radioativa exceder o potencial de ionização de uma molécula, a retirada de elétrons dessa molécula pode acontecer. É importante ressaltar que devido a sua forma de ação, seu uso não é recomendado para compostos aquosos que possuam proteína em sua composição (Parsons, 2012; Madigan, Martinko e Parker, 2004; Roberts, 2013; Vermelho, 2006; Sandle, 2013).

Diversas fontes de radiação ionizante estão disponíveis para uso, podendo-se destacar as de fótons de alta energia, como o raio-X, os radioisótopos Cobalto 60 e o Césio 137 e as de elétrons de alta energia que são gerados por aceleradores de elétrons. Devido a sua alta eficiência e custos menos onerosos, os nuclídios radioativos Cobalto 60 e o Césio 137 são os mais utilizados. A dose de radiação absorvida por uma matéria é quantificada em unidades de kGray, onde 1 Gray corresponde a absorção de 1 J de energia radioativa por 1 Kg de matéria. A dose de radiação necessária para a inativação celular varia de acordo com a espécie, função da célula e diferenças de tamanho de seus genomas, por exemplo, endoespóros bacterianos possuem maior resistência que sua forma vegetativa, assim como os vírus costumam ser mais resistentes que as bactérias. A dose de radiação requerida para inativar 10% de um número de células ou vírus é chamada de *D10*, podendo ser comparada à dose de redução decimal aplicada para o método de controle microbiano por calor discutido no tópico 7.2.1. Esses valores para bactérias variam entre 1-4 kGy e para vírus entre 3-8 kGy, mas para alcançar níveis de garantia de segurança da esterilidade geralmente são utilizados 25 kGy, que irão reduzir a carga microbiana em 6 logs (10^{-6}), esse ciclo pode ser repetido para garantir ainda mais a eficiência do processo. Esses processos são monitorados por dosímetros para controlar a quantidade de radiação

recebida pelo material, já o tempo de permanência frente à bomba com o radioisótopo é calculado a partir das condições de atividade da fonte, natureza do material a ser esterilizado e a distância do material da fonte (Ricoeur, 2011; Parsons, 2012; Vermelho, 2006; Brasil, 2001).

7.2.5. Microfiltração

Este método de controle microbiano é baseado na exclusão física de micro-organismos, como fungos e bactérias de fluidos (líquidos ou gases) por uma membrana filtrante ou outro dispositivo poroso com a capacidade de retê-los. É utilizado principalmente para substâncias termolábeis e/ou que não possam ser esterilizadas por meio de outro método de controle microbiano. Seu uso se estende também para salas e ambientes que precisam ter a qualidade do ar monitorada, como salas de cirurgia, de produção de meios de cultura, injetáveis e biorreatores de fermentação, por exemplo.

Existem diferentes tipos de filtros confeccionados por uma variedade de materiais e com finalidades diferentes de aplicação. Os filtros de profundidade são constituídos por lã de vidro, cerâmicas porosas, metais sinterizados, algodão, lã, resinas laminadas, asbestos ou terra diatomácia. Seu mecanismo de ação ocorre pelo aprisionamento mecânico das partículas e adsorsão aleatória no interior da matriz filtrante, e são importantes principalmente em etapas de pré-filtração, onde é removida grande carga de material particulado. É importante ressaltar que para ser considerado um processo de microfiltração os tamanhos dos poros devem ser de 0,1 até 0,8 μm (capazes de reter micro-organismos como leveduras e bactérias), logo, o uso de filtros de profundidade como aqui descrito pode não consistir em um processo de microfiltração devido a sua capacidade de apenas reter partículas brutas. No entanto, seu uso pode ser feito em conjunto com filtros de poros menores ajudando na eficiência do processo e aumentando a vida útil dos filtros de microfiltração (Levy, 2001; Cote, 2013).

Filtros HEPA (High Efficiency Particulate Air) possuem grande capacidade de retenção de partículas finas, sendo utilizados em etapas finais de um processo de limpeza do ar e também em câmaras de fluxo laminar em microbiologia para a realização de procedimentos assépticos (Figura 7.10). Desse modo, evita-se a contaminação do objeto manipulado pelo ar externo e também do manipulador pelo material com o qual trabalha devido à presença de uma cortina de ar. O ar contaminado é insuflado para o interior da câmara e forçado em fluxos paralelos a passar

pelo filtro HEPA, outra parte acaba sendo exaurida para o ambiente externo após sua filtragem por um segundo filtro localizado na exaustão do equipamento. Esse tipo de filtro por definição é capaz de remover 99,97% das partículas de até 0,3 µm de tamanho, e sua vida útil consegue ser prolongada se utilizado pré-filtros em etapas anteriores, evitando sua saturação por partículas maiores (Davis e Shade, 2013).

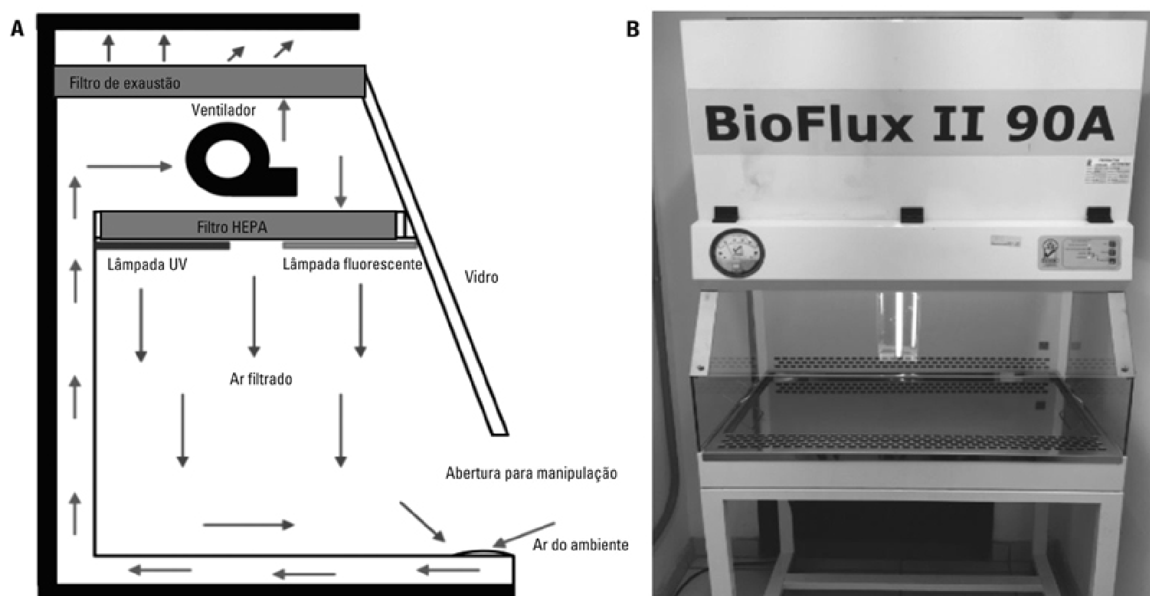


FIGURA 7.10 Câmara de fluxo laminar em esquema lateral mostrando o mecanismo de filtração do ar (A) e sua visão frontal (B).

O uso de membranas filtrantes possui ampla aplicação dentro da microbiologia para a contagem de micro-organismos em determinado fluido, assim como na esterilização do ar e líquidos utilizados na produção de fármacos, meios, tampões e outros reagentes ou produtos que não possam sofrer a ação do calor. Existem diversos tipos de membrana com porosidades diferentes, onde as mais comuns usadas na microbiologia possuem poros de 0,45 µm e 0,22 µm. No entanto, de acordo com a Food and Drug Administration (FDA) membranas com grau de esterilidade são aquelas com poros de 0,22 µm de diâmetro, baseada na redução logarítmica da bactéria *Breviundimonas diminuta,* que é um bastonete Gram-negativo, não fermentador de lactose encontrada no ambiente. Embora o filtro 0,22 µm seja bastante empregado para filtrar soluções para microbiologia e biologia molecular e retenha a maioria das bactérias e leveduras, ele não garante a retenção de *Mycoplasma,* que precisa estar

isenta do cultivo celular de tecido, logo um filtro de diâmetro 0,1 μm é o mais recomendado para essa proposta. (Lee, 2015; Schmidt, 2015).

Membranas filtrantes (Figura 7.11) podem ser confeccionadas por diferentes materiais que irão influenciar no tipo de fluido que deve ser filtrado e também no tamanho dos poros dependendo da composição do polímero utilizado. Soluções aquosas de uma maneira geral são preferencialmente esterilizadas em membranas compostas por acetato de celulose ou por esteres de nitrato. Solventes orgânicos como dimetilsulfóxido (DMSO) devem ser filtrados em membranas compostas por polímeros hidrofóbicos que suportam a ação de solventes, como o Nylon e o Teflon. É importante notar que materiais como o Nylon possuem a capacidade de se ligar a proteínas, portanto, deve-se evitá-los caso haja o interesse em manter essas moléculas no filtrado, uma alternativa é optar por membranas que não tenham afinidade em reter essas moléculas (*low protein binding*).



FIGURA 7.11 Esquema de montagem para filtração de líquidos utilizando a técnica da membrana filtrante. *Fonte*: Imagem cedida pelo laboratório de Engenharia de Bioprocessos da Escola de Química da UFRJ.

Outro aspecto relevante na microfiltração é a velocidade na qual ela ocorre. Existem casos que a filtração precisa ser lenta, como em condições de temperatura baixa para evitar a desnaturação de algum composto da matéria-prima. Por outro lado microfiltrações podem ocorrer de maneira mais ágil quando existe uma grande quantidade de fluido para ser filtrado e quando se quer evitar a formação de espuma e também a desnaturação

de algum composto. Nestes casos o processo pode ocorrer com a atuação da pressão positiva de um gás inerte previamente esterilizado em cima do material a ser filtrado (Cote, 2013; Sandle, 2013).

7.2.6. Controle e monitoramento dos métodos

Os diferentes métodos que são empregados para o controle do crescimento microbiano precisam confirmar sua eficiência, reprodutibilidade e confiabilidade. Dessa maneira, os aparelhos e processos empregados para tal finalidade são submetidos a testes de validação para verificar seu funcionamento satisfatório. Para cada método é utilizado um tipo de indicador e critério de análise.

Tanto indicadores químicos, como fitas termosensíveis ou indicadores biológicos podem ser empregados. Os indicadores biológicos desempenham papel importante na verificação da eficiência dos métodos. Para o controle dos métodos que utilizam o calor úmido (autoclaves) o indicador biológico padrão consiste em uma suspensão ou carreador com uma grande carga de esporos bacterianos (10^6) de *Geobacillus stearothermophilus.* Ao final do ciclo de autoclavagem é garantida a eficiência do processo caso os esporos não sejam capazes de crescer em meio de cultura. Outros indicadores como *Bacillus coagulans, Clostridium sporogenes* ou *Bacillus subtilis* podem ser também utilizados para validar um processo que ocorra em temperaturas menos elevadas, como tipicamente ocorre na indústria. Para a esterilização por calor seco o *Bacillus atrophaeus* pode ser empregado como bioindicador, uma vez que este demonstra resistência a esse tipo de método de controle microbiano (Junker, 2013; Rogers, 2012; Schmidt, 2015). A verificação da eficiência do processo por radiação ionizante por sua vez pode ser feita utilizando a espécie *Bacillus pumilus,* onde a dose padrão geralmente empregada de 25 kGy é capaz de inativá-la (Sandle, 2013; Ward, 2012). No caso da membrana filtrante, o micro-organismo para verificar a capacidade de esterilidade dos filtros é a *Brevundimonas diminuta,* que possui tamanho ligeiramente maior (0,3 µm) que os poros de membrana com grau de esterilidade determinado pela FDA (0,22 µm). De acordo com as atuais boas práticas de fabricação (Current Good Manufacturing Practice – cGMP) determinadas pela FDA, a membrana deve ser capaz de reter completamente uma carga bacteriana mínima de 10^{-7} unidades formadoras de colônia (UFC) de *Brevundimonas diminuta* (ATCC 19146) por centímetro quadrado de superfície da área da membrana. Além disso, para verificar a esterilidade do filtrado pode-se retirar de maneira asséptica alíquotas e

realizar testes de esterilidade com as amostras, inoculando-as em meios de cultura específicos e incubando-as em condições controladas para a análise (Schmidt, 2015; Sandle, 2013).

7.2.7. "Sterilization-in-Place" (SIP)

O sistema "Sterilization-in-place" ou "Steam-in-place" (SIP) se refere ao método de se esterilizar um equipamento ou materiais de um processo no seu local de uso ou de instalação. Normalmente se utiliza vapor saturado como agente esterilizante, mas outros gases e vapores podem ser utilizados, como vapor de água oxigenada e água superaquecida. Assim, este sistema pode substituir autoclaves e estufas, e permite a esterilização de vários componentes ao mesmo tempo, facilitando a manutenção das condições assépticas no processo (Noble, 1999). A operação neste sistema é similar à de uma autoclave, com uma etapa inicial de purga de ar, aquecimento, a esterilização em si (normalmente 121°C, 1 bar) e, por fim, a substituição do vapor por ar estéril. Mais detalhes operacionais podem ser vistos em Schmidell *et al.* (2001).

7.3. Métodos químicos

7.3.1. Fenóis

Fenol foi um dos primeiros desinfetantes utilizados em hospitais devido a sua propriedade antimicrobiana. Em altas concentrações, ele penetra e rompe a parede celular microbiana, interagindo com os lipídeos e precipitando as proteínas celulares. Por isso, também está vinculado a processos de irritação dérmica e despigmentação. Vários derivados de fenol (Figura 7.12A) têm função similar como *o*-fenilfenol (Figura 7.12B), *o*-benzil-*p*-clorofenol (Figura 7.12C), *p*-terc-butilfenol (Figura 7.12E) e *p*-terc-amilfenol (Figura 7.12F), mas com menor poder irritante e maior atividade antibacteriana. Seu uso é mais frequente na limpeza de materiais e superfícies que não entrarão em contato com tecidos vivos (Rutala *et al.*, 2008; Tortora *et al.*, 2016). Outro derivado fenólico são os bisfenóis, como o hexaclorofeno (Figura 7.12J), que apresenta uma ação eficiente sobre *Staphylococcus* sp. e *Streptococcus* sp., e o triclosan (Figura 7.12M), ingrediente de alguns sabonetes antibacterianos (principalmente bactérias Gram-positivas), e age inibindo uma das enzimas da via de biossíntese de ácidos graxos, afetando a integridade da membrana plasmática (Tortora *et al.*, 2016).

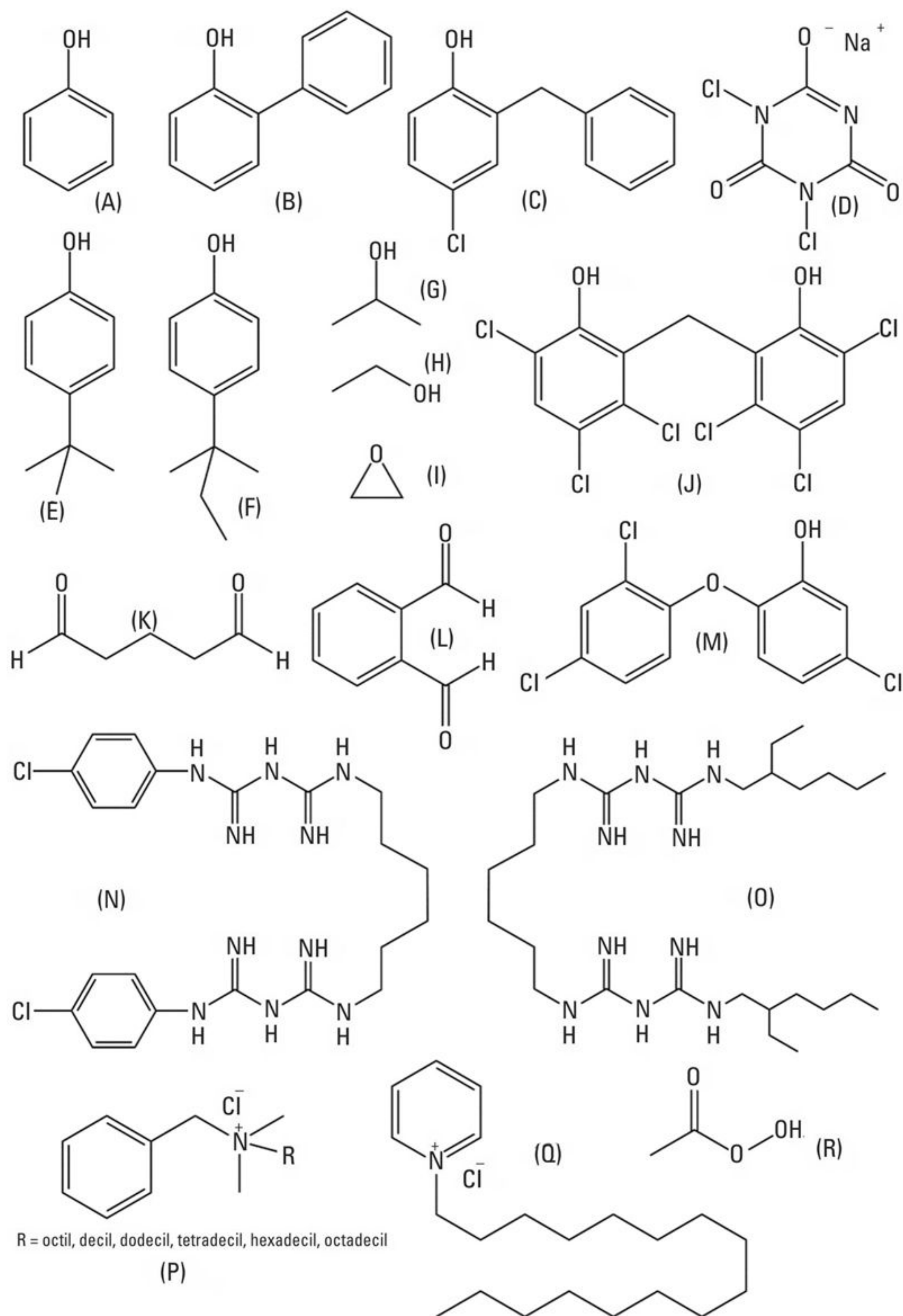


FIGURA 7.12 **Agentes químicos para esterilização e desinfecção. (A) Fenol; (B) *o*-Fenilfenol; (C) *o*-Benzil-*p*-clorofenol; (D) Dicloroisocianurato de sódio; (E) *p*-terc-**

Butilfenol; (F) *p*-terc-Amilfenol; (G) Isopropanol; (H) Etanol; (I) Óxido de etileno; (J) Hexaclorofeno; (K) Glutaraldeído; (L) *o*-Ftalaldeído; (M) Triclosan; (N) Clorexidina; (O) Alexidina; (P) Cloreto de benzalconio; (Q) Cloreto de cetilpiridinio; e (R) Ácido peracético.

7.3.2. Biguanidas

Biguanidas apresentam atividade principalmente contra membranas celulares de bacterias Gram-positivas, mas também são efetivas contra as Gram-negativas, com exceção de Pseudomonas sp., e também não atuam sobre esporos. Os mais conhecidos desta classe são a clorexidina (Figura 7.12N), utilizada para controle microbiano na pele e em mucosas, e a alexidina (Figura 7.12O), que é similar à clorexidina e tem uma ação mais rápida (Tortora *et al*., 2016).

7.3.3. Alcoóis

Há dois álcoois que apresentam características antimicrobianas: etanol (Figura 7.12H) e isopropanol (Figura 7.12G), sendo mais bactericidas do que bacteriostáticos, podendo ainda agir sobre fungos, mas não sobre esporos bacterianos. A faixa ótima de concentração bactericida está entre 60 a 90% v/v em água. Seu principal mecanismo é a desnaturação de proteínas microbianas, onde remove a água ligada à estrutura tridimensional da proteína, mas também interage com lipídeos da membrana celular. Seu uso é comum como antisséptico, permitindo a limpeza de tecidos vivos ou superfícies, não deixando resíduo, pois evapora rapidamente, além de ter baixa toxidez. O isopropanol tem uma ação desinfetante um pouco superior à do etanol, já que é menos volátil. Os álcoois também podem aumentar a efetividade de outros agentes químicos (Rutala *et al*., 2008; Roberts, 2013; Tortora *et al*., 2016).

7.3.4. Halogênios

Os halogênios mais utilizados como agentes antimicrobianos são o iodo e o cloro, sendo ativos contra bactérias, endósporos, fungos e vírus. Iodo prejudica a síntese proteica e altera a membrana celular formando complexos com aminoácidos e ácidos graxos insaturados. Normalmente, o iodo está disponível na forma de tinturas (soluções hidroalcoólicas) e iodóforos (iodo combinado a molécula orgânica, sendo liberado lentamente) para uso como antisséptico. Um exemplo é a Betadina que

apresenta a povidona (polivinilpirrolidona) e o iodo, tendo como vantagem não manchar e ser menos irritante. Já o cloro tem sua ação desinfetante e oxidante devido à formação de hipoclorito (OCl^-) na presença de água (água sanitária, 5,25 a 6,15%), podendo influenciar na oxidação e cloração de enzimas e aminoácidos, inibição de síntese proteica e de DNA, diminuição de adenosina trifosfato, ou até mesmo do consumo de oxigênio, mas tem baixa efetividade na presença de altas concentrações de matéria orgânica, além de possibilitar a corrosão de metais. Pode estar na forma de sais de sódio ou cálcio, sendo 2500 ppm efetivo para higienização de rotina com uma exposição de no mínimo 30 min. Outros agentes clorados são: o dióxido de cloro (ClO_2) na forma gasosa, desinfetante de superfícies e que não deixa resíduos, e dicloroisocianurato de sódio (Figura 7.12D), que atua como sanitizante em sistemas de tratamento de água, liberando cloro paulatinamente (Rutala *et al.*, 2008; Roberts, 2013; Sandle, 2013; Tortora *et al.*, 2016).

7.3.5. Óxido de etileno

Dentre os métodos de esterilização por gás e vapor, os que utilizam o óxido de etileno (Figura 7.12I) são os mais comuns, principalmente sobre objetos termolábeis ou sensíveis à radiação, como materiais plásticos, ópticos, elétricos e equipamentos médicos, sendo efetivo em esterilizar a parte interna e externa do material. Óxido de etileno é um agente alquilante atuando sobre DNA e proteínas de bactérias, fungos e endósporos, atuando sobre os grupos nitrogenados e fosfóricos. Uma preocupação neste método é a presença de resíduos como etilenoglicol e etileno cloridrina que são tóxicos, além da própria toxidez deste agente (só é permitido 1 ppm em um período de exposição médio de 8 h). Há dois métodos para se realizar esta esterilização: câmara de gás, que utiliza gases carreadores como CO_2 e clorofluorocarbonos e grandes quantidades de óxido de etileno em uma área grande fechada, e microdose, que minimiza o teor de gás utilizado (200 a 800 mg/L), em condições entre 30-60°C, umidade de 30%, durante 3 h de ciclo, no mínimo, sendo necessária uma aeração de até 12 h para remoção dos resíduos tóxicos (Sandle, 2013).

7.3.6. Surfactantes

Surfactantes são compostos associados à propriedade de diminuir a tensão superficial de uma solução, facilitando a sua emulsificação. Dentre eles, há sabão (sais de ácidos graxos), e detergentes aniônicos que ajudam na

remoção mecânica de sujidades e micro-organismos de tecidos vivos e superfícies, agindo na membrana plasmática, assim como os compostos quaternários de amônia (quats), que são surfactantes catiônicos, atuando principalmente contra bactérias Gram-positivas e fungos, sem ação contra endósporos. Exemplos são o cloreto de benzalcônio (Figura 7.12P) e o de cetilpiridinio (Figura 7.12Q), que apresentam boa atividade antimicrobiana e não têm toxidez, mas podem ser neutralizados por sabões e detergentes aniônicos (Rutala *et al.*, 2008; Tortora *et al.*, 2016).

7.3.7. Peróxidos e ozônio

Peróxidos são agentes oxidantes que apresentam propriedades antissépticas e esporocidas, tendo como exemplos o peróxido de hidrogênio (água oxigenada, H_2O_2) e o ácido peracético (Figura 7.12R). Podem ser utilizados na forma líquida ou gasosa (aerossol e vapor) na esterilização de salas limpas em hospitais (6 a 25%), lentes de contato (3% por 2 a 3h), sendo clivados em água e oxigênio na presença de catalase ou catalisadores como platina. Seu mecanismo de ação é relacionado com a produção de radicais livres (OH* e OOH*) que ataca lipídeos da membrana celular, DNA e proteínas microbianas. O ácido peracético pode ser corrosivo, mas consegue inativar a maioria dos micro-organismos em menos de 5 min em uma concentração menor que 100 ppm, e na presença de matéria orgânica esse valor aumenta para uma concentração fixa entre 200 e 500 ppm (Rutala *et al.*, 2013; Sandle, 2013; Tortora *et al.*, 2016).

O ozônio (O_3) é forma ativada do oxigênio, com três átomos, normalmente formada na presença de campos de alta energia, com tempo de meia vida menor que 30 min, e também um agente oxidante, atuando na membrana celular microbiana e causando o seu rompimento, principalmente de bactérias, e utilizado na esterilização de água e de ar, e também como desinfetante para superfícies, e depois clivado na presença de luz ultravioleta (254 nm) ou por degaseificação, pois tem uma toxidez elevada e também pode ser corrosivo frente a membranas de poliamida, resinas de troca iônica e elastômeros (Sandle, 2013; Tortora *et al.*, 2016).

7.3.8. Aldeídos

Formaldeído (CH_2O) é utilizado como desinfetante e esterilizante tanto no estado líquido quanto no gasoso. Normalmente, formaldeído é vendido na forma de uma solução 37% m/v chamada formalina, atuando como bactericida, fungicida e esporocida, mas devido a sua toxidez tem uso

limitado, tem uma exposição permitida em um período de 8h se estiver em uma concentração de 0,75 ppm. Atua como um agente alquilante sobre grupos amino e sulfidrila das proteínas e sobre as bases purínicas.

Paraformaldeído, um polímero de 8 a 100 monômeros de formol, pode ser vaporizado para descontaminação gasosa de cabines de fluxo laminar, principalmente quando é necessário o acesso a partes seladas da cabine. Lembrando que o uso de aldeídos na forma gasosa é perigoso, já que tem toxidez alta.

Outro agente alquilante utilizado é o glutaraldeído (Figura 7.12K), se tornando esporocida em soluções alcalinas (pH 7,5-8,5) a 2%, com um tempo de estocagem de 14 dias, devido à polimerização do material, que reduz sua atividade biocida. Para aumentar seu tempo de meia vida para um mês, algumas formulações foram desenvolvidas, como glutaraldeído-fenol-fenato de sódio. Uma vantagem do seu uso é de não possuir propriedades corrosivas sobre materiais metálicos e poliméricos.

O-Ftalaldeído (Figura 7.12L) normalmente é apresentado como uma solução aquosa a 0,55% m/v, que também tem ação alquilante, mas com menor possibilidade de fazer ligações cruzadas, mas em compensação consegue interferir na parede celular de micobactérias e das Gram-negativas e no processo de germinação de esporos devido seu grupo hidrofóbico. Em relação ao glutaraldeído, ele tem grande estabilidade ao pH (3 a 9), não é irritante, pouco odor, e tem boa compatibilidade com materiais, o único porém é que interage com proteínas, deixando uma mancha cinza, inclusive na pele, necessitando de cuidados na manipulação (Rutala *et al.*, 2008; Roberts, 2013; Tortora *et al.*, 2016).

7.3.9. Métodos de avaliação da atividade antimicrobiana de desinfetantes e antissépticos

O estudo e quantificação da eficiência de agentes biocidas teve início logo após a detecção de bactérias que causam infecções e deterioração. Na tentativa de matar e quantificar o efeito bactericida de agentes químicos, Robert Koch descreveu um teste de desinfetante em 1881, num artigo publicado na *Über Desinfektion*. O teste descrito é muito simples é foi inicialmente denominado de teste de carreador, do inglês *carrier test*, nele um fio de seda (o carreador) foi submerso numa cultura líquida contendo *Bacillus anthracis* e, após seco, o fio contaminado foi imerso em soluções contendo o agente químico desinfetante durante um dado tempo de exposição. Em seguida, o fio foi cultivado em ágar nutriente, e a ausência de crescimento indicava, então, a eficiência do desinfetante. Nesse

primeiro momento, a possibilidade de os resíduos bacteriostáticos do desinfetante serem levados para o meio da subcultura não foi considerada, o que pode levar a um resultado falso positivo, sendo então necessária a neutralização do desinfetante antes do carreador ser imerso em ágar nutriente.

No Brasil, é a Resolução RDC n° 14/2007 da ANVISA que regulamenta as condições para o registro dos produtos saneantes com ação antimicrobiana. Segundo este documento, os produtos com ação antimicrobiana devem ter sua eficácia confirmada a partir de métodos definidos pela *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) ou pelo Comitê Europeu de Normatização (CEN). Neste documento a ANVISA também preconiza os micro-organismos a serem empregados na avaliação da atividade antimicrobiana de um determinado produto saneante em função de sua aplicação. No caso de desinfetantes a serem aplicados na indústria alimentícia e afins, os micro-organismos a serem testados são *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* e *Escherichia coli.*

A AOAC recomenda o método bastante simples de diluição de uso, cujo resultado é qualitativo. O CEN, após anos de desenvolvimento de métodos para desinfetantes e antissépticos, vem propondo a aplicação de três níveis de testes. Na fase 1 avalia se o produto, diluído em água destilada, tem um nível de atividade na ausência de outra matéria orgânica. Nesta fase, somente uma stirpe de *S. aureus* e *P. aeruginosa* é utilizada. A fase 2 determina a atividade em condições de uso simuladas com alguma carga orgânica e alguns micro-organismos teste, tanto em suspensão (etapa 1) quanto em superfícies (etapa 2). A fase 3 consiste em ensaios "em uso", já no campo da aplicação, em que a performance do produto é avaliada em condições reais, de fato, para os quais não existem testes padrões disponíveis (Payne, Babb e Bradley, 1999). Neste capítulo, no que diz respeito aos testes recomendados pelo CEN, só serão apresentados aqueles específicos para avaliação de antissépticos e desinfetantes para uso alimentício, industrial, doméstico e em áreas institucionais.

7.3.9.1. Método da diluição de uso

O método de diluição de uso é o método adotado pela AOAC e um dos indicados pela ANVISA para avaliação da eficiência de desinfetantes. É um exemplo de *carrier test*, similar ao primeiro teste realizado por Koch. Neste teste, 60 cilindros de aço inoxidável, meticulosamente selecionados e esterilizados, funcionam como carreadores e são transferidos para a

cultura microbiana teste mantendo contato durante 15 minutos. Após esse período os carreadores são removidos, colocados sobre papel filtro em placa de petri e incubados a 37°C por 40 minutos. A solução do desinfetante diluída na concentração indicada é então distribuída em tubos de ensaio. Os cilindros secos e contaminados são, então, adicionados cuidadosamente a cada tubo em intervalos de tempo definidos. Após o tempo de contato definido os cilindros são removidos dos tubos com desinfetante e transferidos para os tubos de subcultura contendo meio de cultivo e neutralizante e mantidos em contato por 10 minutos. O uso do neutralizante evita resultados falso negativo, causado por resíduos que podem ser carreados para a subcultura. Os cilindros são, então, transferidos para outros tubos de subcultura e devem ser incubados durante 48 horas (Figura 7.13). É importante verificar a viabilidade do meio de subcultura adicionando um cilindro contaminado e seco a um tubo contendo o meio onde deve ocorrer crescimento do micro-organismo teste, além de verificar a esterilidade do meio e do cilindro, incubando-os nas mesmas condições em que o esperado é a ausência de crescimento microbiano. Os resultados são então expressos de forma qualitativa como (P) presença de crescimento e (N) ausência de crescimento. O desinfetante é considerado eficaz se for capaz de matar os micro-organismos teste sobre 59 dos 60 cilindros utilizados (FIOCRUZ). As desvantagens deste método estão no fato da impossibilidade de padronizar a quantidade de inóculo sobre a superfície do carreador, além da sua viabilidade após secagem (Reybrouck, 1998).

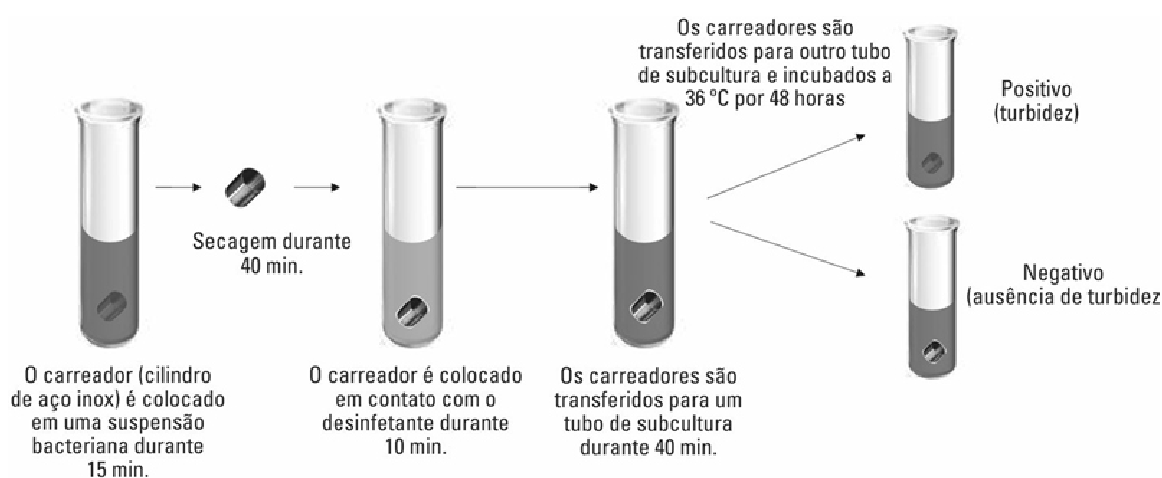


FIGURA 7.13 **Esquema do método da diluição de uso.**

7.3.9.2. Testes em suspensão

Existem diferentes tipos de testes em suspensão: teste em suspensão qualitativo, teste para determinação do coeficiente de fenol e teste em suspensão quantitativo. Em todos os diferentes testes o inóculo a ser adicionado ao desinfetante é uma suspensão microbiana padronizada. Após um tempo de exposição, uma amostra é examinada para determinação da morte ou não do inóculo. Para isso, uma alçada da suspensão bacteriana em contato com o desinfetante é subcultivada para observação dos micro-organismos sobreviventes. Essa determinação pode ser qualitativa ou quantitativa. Assim como no teste de diluição de uso, na determinação qualitativa o resultado é expresso somente como (P) presença de crescimento ou (N) ausência de crescimento (Reybrouck, 1998). Já os métodos em suspensão mais utilizados determinam quantitativamente os micro-organismos sobreviventes, e esse número é então comparado ao tamanho do inóculo inicial. Para determinação quantitativa, após período exigido de exposição, uma amostra da suspensão teste é transferida para um tubo, onde é neutralizada e diluída sucessivamente para contagem de viáveis em placa. O resultado geralmente é denominado efeito microbicida (EM), e é obtido usando a seguinte equação:

$$EM = Nc - Nd$$

Em que:

Nc = valor de $\log_{10}$ da suspensão inicial

Nd = valor $\log_{10}$ da suspensão final após tratamento com desinfetante.

O teste em suspensão quantitativo é o teste básico aplicado na fase 1 de testes para avaliação da eficiência de desinfetantes recomendado pelo Comitê Europeu de Normalização (CEN/TC 216 “Desinfetantes e Antissépticos Químicos”). A redução logarítmica varia de acordo com o micro-organismo testado, para bactérias (EN 1040) determina-se um efeito microbicida igual ou maior que 5, em que pelo menos 99,999 % dos micro-organismos foram mortos após 5 minutos de contato para considerar o desinfetante ativo, já para fungos (EN 1275) deve ser ≥ 4 após 30 segundos de contato; e para esporos bacterianos (EN 14347) deve ser ≥ 4 após 30, 60 ou 120 minutos de contato (Humphreys, 2011; Reybrouck, 1998). Esse tipo de teste também é recomendado pela Associação Francesa de Normalização (AFNOR), da Sociedade Alemã de Higiene e Microbiologia

(DGHM), da Sociedade Alemã de Medicina Veterinária (DVG) (A.P. Fraise, 1999; Payne *et al.*, 1999; Reybrouck, 1998).

Já na etapa 1 da fase 2 do CEN, o teste em suspensão deve ser realizado em condições representativas de uso. A ideia é avaliar a atividade de um desinfetante contra micro-organismos sob condições simuladas de uso (Sandle, 2013). O teste consiste em inocular uma amostra preparada de desinfetante simulando uma condição "limpa" e uma condição "suja", em que uma substância interferente que mimetize a presença de matéria orgânica, tal como solução albumina do soro bovino (BSA), é adicionada em uma determinada concentração para simular "sujeira". E o critério para considerar o desinfetante eficiente para bactérias, fungos e esporos está apresentado na Tabela 7.1.

Tabela 7.1

Organismos e critérios aplicados aos testes recomendados pelo Comitê Europeu de Normalização na etapa 1 da fase 2 para avaliação de desinfetantes e antissépticos de uso industrial

EN	*1276* **Atividade bactericida**	*1650* **Atividade fungicida**	*13704* **Atividade esporicida**
Organismos	*Escherichia coli* *Enterococcus hirae* *Staphyloccocus aureus* *Pseudomonas aeruginosa*	*Aspergillus brasiliensis* *Candida albicans*	*Bacillus subtilis*
Tempo de contato	5 minutos	15 minutos	60 minutos
Critério (redução do log)	5	4	3

Fonte: Adaptado de Humphreys e colaboradores (2013).

7.3.9.3. Coeficiente fenólico

Testes para determinação do coeficiente fenólico são essencialmente testes em suspensão qualitativos, em que a atividade do desinfetante a ser testado é comparada com a do fenol. Este teste padrão de desinfetante foi desenvolvido por Rideal e Walker em 1903, e hoje é padronizado pela AOAC. Originalmente o micro-organismo testado era a *Salmonella typhi,* a qual é bastante sensível a compostos fenólicos, e que vem sendo utilizada até hoje pelo método da AOAC 955.11, além de outras bactérias.

O coeficiente fenólico pode ser definido como o poder microbicida de um desinfetante comparado com o do fenol. Usada extensivamente para testar desinfetantes, esta técnica utiliza linhagens específicas, tais como

Salmonella typhi ATCC 6539, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Pseudomonas aeruginos* ATCC 15442. O procedimento indicado é preparar uma série de tubos contendo 5 mL com diferentes diluições do desinfetante a ser testado e outra série de tubos contendo várias diluições de fenol. Os tubos são, então, inoculados a partir de uma cultura líquida de 24 horas da bactéria teste. A intervalos de 5, 10 e 15 minutos uma amostra é removida do tubo e transferida com uma alça para um tubo estéril contendo meio de crescimento (Figura 7.14). Os subcultivos são incubados por 14-48 horas e examinados após este período quanto ao crescimento ou não da bactéria. A maior diluição do desinfetante teste capaz de inibir o crescimento do micro-organismo em 10 minutos, mas não em 5 minutos, é dividida pela maior diluição de fenol seguindo a mesma regra. O número obtido é o coeficiente fenólico propriamente dito (AOAC, 2000).

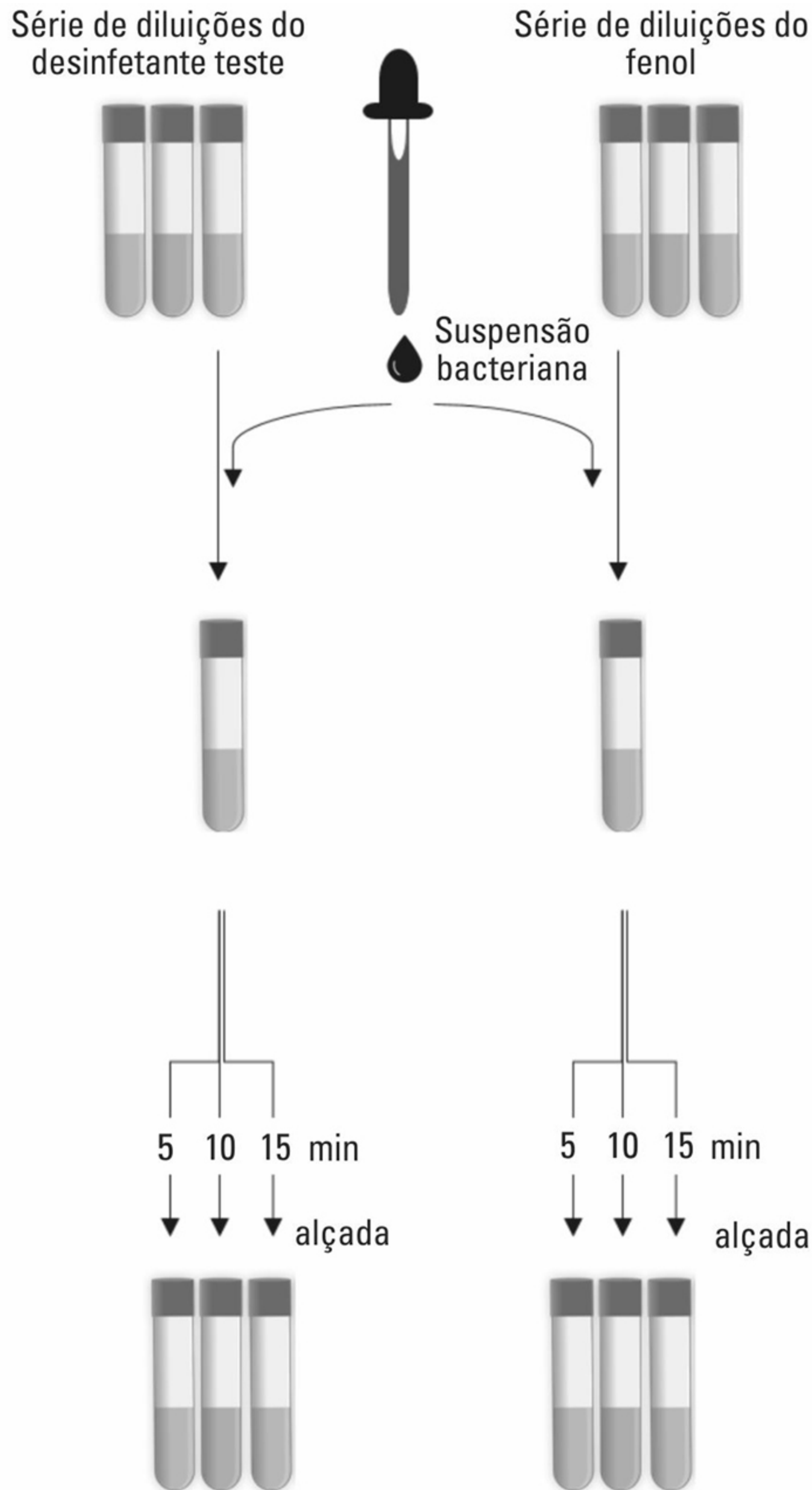


FIGURA 7.14 **Esquema do método de coeficiente de fenólico.**

Tabela 7.2

Exemplo de resultado obtido com o teste de coeficiente fenólico

Desinfetante	Diluição	Tempo de exposição (min)		
		5	10	15
Desinfetante (x)	1:400	-	-	-
	1:450	+	-	-
	1:500	+	+	-
	1:550	+	+	-
	1:600	+	+	+
Fenol	1:70	-	-	-
	1:80	+	-	-
	1:90	+	+	+
	1:100	+	+	+
Coeficiente fenólico = 450/80 = 5,625				

(+) crescimento, (-) ausência de crescimento.

7.3.9.4. Testes em superfície

Os testes em suspensão são, de fato, os mais predominantemente aplicados e padronizados quando o assunto é estimar a atividade microbicida de um desinfetante em solução. Porém, muito se discute acerca da real possibilidade de predição de eficiência que estes testes oferecem frente às circunstâncias práticas, especialmente no que diz respeito aos micro-organismos aderidos a superfícies (van Klingeren *et al.*, 1998). Em vista disso, a fase 2 (etapa 2) (EN 13697) do método preconizado pelo CEN visa avaliar a eficiência de desinfetantes em superfícies, além de exigirem a mimetização de condições reais de uso, ou seja, situações de limpeza (0,3 g/L de BSA) e de "sujeira" (3 g/L de BSA), são essencialmente testes práticos, do inglês *practical tests*. Nesse teste, discos de aço inoxidável com dimensões determinadas são inoculados com uma suspensão bacteriana ou fúngica padronizada, e são incubados a 36°C por 40 minutos. Na sequência, aos discos contaminados e secos, é adicionada uma alíquota do produto teste e, após 5 minutos de contato para bactérias e 15 minutos para fungos com a superfície contaminada dos discos, eles são mergulhados em solução contendo neutralizador. O tubo contendo o disco em solução neutralizante é, então, agitado e uma alíquota é retirada para realização de diluições seriadas para contagem em placas (Figura 7.15). Os resultados são expressos como na equação anterior e o critério

para considerar um desinfetante eficiente é a redução logarítmica ≥ 4 para contagem de bactérias e ≥ 3 para contagem de fungos (Humphreys *et al.*, 2013).

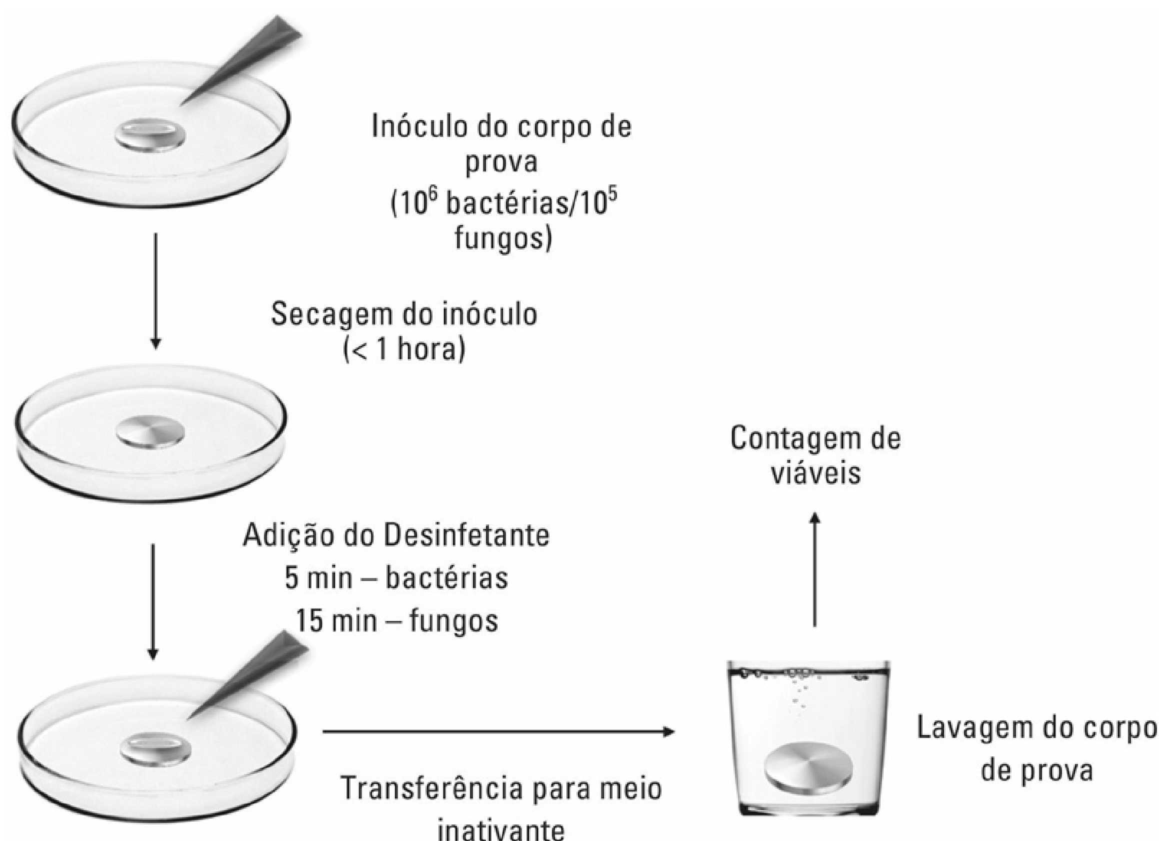


FIGURA 7.15 Esquema de teste em superfície referente à fase 2 da etapa 2 do método preconizado pelo CEN.

7.3.9.5. Teste de capacidade

Ao realizar um procedimento de limpeza com algum instrumento, como, por exemplo, um esfregão mergulhado em um balde contendo uma solução desinfetante, a cada uso o esfregão volta ao balde e leva mais sujeira para a solução desinfetante, ou seja, a carga microbiana na solução vai aumento gradativamente. Com esse simples exemplo, podemos entender a essência do teste de capacidade do desinfetante, que é avaliar a habilidade deste em reter a atividade antimicrobiana numa situação de aumento de carga microbiana (Reybrouck, 1998).

O teste de capacidade mais conhecido é o teste de Kelsey-Sykes desenvolvido em 1965. Nele um volume pré-determinado de suspensão

bacteriana é adicionado à diluição de uso do desinfetante e após um dado tempo de exposição uma amostra é retirada para observação de sobreviventes inoculando alguns meios de cultivo. Após um certo período, uma segunda adição da suspensão bacteriana é efetuada e um novo subcultivo é realizado, em intervalos constantes. Este processo pode ser repetido várias vezes. A suspensão bacteriana pode ser feita na condição de limpeza, em água, ou na condição de "sujeira", na qual a suspensão contém leveduras (Reybrouck, 2004).

7.3.9.6. Teste de difusão em ágar

A atividade antimicrobiana de agentes químicos também pode ser avaliada em meio sólido através da observação de zonas de inibição. O método de difusão em ágar é bastante utilizado em laboratórios de ensino para avaliar a eficácia de um agente químico. Neste tipo de teste, uma placa contendo ágar nutriente é inoculada com organismo teste, e o agente químico é depositado no centro da placa. Se o agente químico se encontra na forma líquida, um disco de papel absorvente impregnado com a solução teste pode ser utilizado no meio sólido. Após o tempo de incubação, seja 24 ou 48 horas, a zona de inibição em torno do disco contendo o agente químico é mensurada. Outra modalidade desse teste não usa disco de difusão, mas sim o agente químico incorporado no ágar nutriente antes de ser colocado na placa. O meio sólido é, então, inoculado como o micro-organismo teste, incubado, e verificado quanto ao crescimento microbiano ao fim do ensaio (Pelczar, Chan e Krieg, 2010).

7.3.10. "Cleaning-in-Place" (CIP)

O sistema "Cleaning-in-place" (CIP) é o método utilizado em processos industriais para limpar tanques, tubulações e até mesmo o ambiente operacional entre as bateladas pela recirculação automática de soluções de detergente e de rinsagem (ou enxague). O processo de lavagem consiste em vários ciclos em que material rinsado é reciclado pelas bombas, válvulas, tanques e outros equipamentos pelo sistema de escoamento. Normalmente, a validação dos procedimentos de limpeza é de grande importância para as indústrias química, farmacêutica e de alimentos. A sequência básica de qualquer processo de limpeza consiste em uma etapa inicial de pré-rinsagem, para remoção das partículas mais grosseiras; a etapa de limpeza, utilizando uma solução de detergente, podendo ser desdobrada em duas etapas (lavagem alcalina e uma ácida, com uma rinsagem entre elas); uma etapa de rinsagem intermediária, para remoção

de todos os traços de detergentes e partículas de sujeira; desinfecção, com uso de agentes químicos e/ou calor; e uma rinsagem final, para remoção de qualquer desinfetante residual.

Os componentes de um detergente clássico e suas propriedades são:

- Bases: NaOH, KOH, Na_2CO_3, $NaHCO_3$, Na_3PO_4, orto- e metassilicato de sódio: atuam dissolvendo matéria orgânica e removendo gorduras, permitindo um bom enxague.
- Ácidos: HNO_3, H_3PO_4, ácidos acético, cítrico e glucônico: dissolvem carbonato e depósitos minerais, mas são corrosivos, indicando a necessidade de incluir um inibidor de corrosão na formulação do detergente, como Na_2SO_3, $NaNO_2$, Na_2SiO_3, hexamina, fenilenodiamina e dimetiletanolamina.
- Surfactantes: compostos anfifílicos solúveis em solventes e água, podendo ser iônicos, não-ionicos e anfotéricos, e o seu tipo vai influenciar na maneira que se dissocia na solução aquosa, e de como vai impactar o meio ambiente.
- Agentes quelantes: ácido etilenodiaminatetraacético (EDTA), polifosfatos de sodioácido cítricos e glucônico: evitam a precipitação de sais presentes na água.
- Dispersantes: amido e carboximetilcelulose: capazes de manter partículas em suspensão.
- Agentes antiespumantes: óleo vegetal, silicones, estearatos e glicóis: evitam a formação de espuma.

Alguns problemas como processo de limpeza inadequado, corrosão, incrustação, entre outros, podem permitir a interação dos micro-organismos com as sujidades, facilitando a formação de biofilmes, e os protegendo da ação dos agentes químicos de desinfecção. Isso pode ser resolvido combinando a ação do detergente com temperaturas acima de 70°C e pHs mais extremos, além de desinfetantes como hipoclorito de sódio, compostos quaternários de amônia, água oxigenada e ácido peracético.

Há quatro tipos de sistemas CIP: sistemas de uso único, de recuperação parcial, de recuperação total e multipropósito. Nos de uso único, as unidades ficam próximas aos equipamentos que serão limpos, e são mais indicados para linhas de operação altamente poluidoras, como os sistemas de trocador de calor, onde o rejeito não pode ser reutilizado e deve ir direto para o sistema de tratamento de efluentes. Nos de recuperação parcial, o detergente e a água de lavagem de um ciclo anterior são reutilizados na etapa de pré-rinsagem do próximo ciclo de lavagem, necessitando de um tanque para isso. O sistema de recuperação completa é

constituído de no mínimo três tanques (um para solução tampão detergente/desinfetante, outro para recuperação da solução de detergente e um de água), sendo que a solução de detergente é reciclada até que seu conteúdo de matéria orgânica esteja muito alto, e a água de lavagem da rinsagem final é utilizada como pré-rinsagem do próximo ciclo. No multipropósito, pequenas CIPs são colocadas perto dos equipamentos a serem limpos, e a solução de detergente é suprida de unidade central de estocagem, no qual se ajusta a concentração e força iônica de acordo com equipamento a ser limpo. Depois a água de lavagem é retornada à unidade central até que a concentração de matéria orgânica seja alta o suficiente para ser descartada (García e Díaz, 2011; Bremer e Seale, 2013).

7.4. Métodos alternativos

7.4.1. Plasma

O plasma muitas vezes é chamado de o quarto estado da matéria depois do líquido, sólido e o gasoso. O termo foi introduzido em 1928 pelo físico-químico Irving Langmuir como uma analogia ao plasma sanguíneo, devido à composição do gás fortemente ionizado. Sua formação é decorrente do uso de um campo magnético para promover a excitação e consequente ionização de um gás entre dois eletrodos, formando uma mistura de núcleos com variadas cargas elétricas e elétrons livres. Essa mistura gasosa de cargas opostas (elétrons e íons) possui uma carga elétrica próxima do zero absoluto.

O plasma pode existir em diferentes estados, o natural e o artificial. O natural compõe o sol, estrelas, ventos solares e aurora boreal, estando portanto em grande parte do universo visível. O plasma artificial é encontrado em displays, lâmpadas fluorescentes, para realizar tratamento de superfícies sólidas e também no setor biomédico. Os processos de esterilização envolvendo o plasma são chamados de esterilização fria, uma vez que o plasma frio é utilizado. Neste tipo, apenas os elétrons são aquecidos a uma temperatura muito superior à dos íons e partículas pesadas não carregadas, no entanto, sua temperatura não fica elevada (temperatura ambiente até aproximadamente 70°C), podendo ser utilizado no tratamento de materiais sensíveis ao calor. A capacidade microbicida do plasma tem origem nas espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidas, na radiação UV liberada e de partículas carregadas, causando estresse químico e ambiental, decompondo a matéria orgânica rapidamente pela oxidação de lipídios de membrana, proteínas e ácidos nucleicos, sendo capaz inclusive de matar esporos bacterianos. Além do efeito químico sobre as células, o impacto térmico também existe, embora seja menos relevante, e causa a partir do efeito eletrostático o rompimento celular. Como demonstrado em outros métodos de controle microbiano, existem tipos de células com maior ou menor resistência aos seus mecanismos de ação. No caso do plasma, bactérias Gram-negativas são menos resistentes devido a sua fina membrana celular enquanto que leveduras e esporos são mais resistentes devido aos polissacarídeos ao redor da célula, organismos planquitônicos também possuem baixa resistência a esse método. Os métodos comerciais disponíveis para gerar o plasma de baixa temperatura e desativar micro-organismos são por meio

da ionização do ácido paracético e peróxido de hidrogênio. O uso do plasma vem sendo mais frequente na área de microbiologia de alimentos, para a eliminação de bactérias deterioradoras de frutas, em aplicações médicas e tem perspectivas de passar a ser mais comum na indústria farmacêutica. Este método, portanto, possui diversas vantagens como a ação esterilizante por meios químicos e físicos combinados e o uso de baixas temperaturas, no entanto ainda é relativamente oneroso (Sandle, 2013; Tortora *et al.*, 2016; Otto *et al.*, 2011; Geyer e Morent, 2012).

7.4.2. Fluidos supercríticos

Os processos clássicos mais comuns de pasteurização e esterilização aplicados à preservação de alimentos, dispositivos médicos e fármacos envolvem o uso de calor. Ao mesmo tempo em que esses procedimentos não são indicados para produtos sensíveis ao calor, existe uma resistência por parte da indústria em relação ao uso de processos a baixa temperatura baseados em irradiação e agentes químicos (como peróxido de hidrogênio ou óxido de etileno) por diversas razões, tais como custo, segurança e implicações ambientais. Uma alternativa ao tratamento por calor é o uso de alta pressão, em que a esterilização acontece em pressões hidrostáticas extremamente altas (4000-8000 bar), o que leva a custos incompatíveis com o mercado. O tratamento com CO_2 supercrítico parece uma alternativa relevante ao tratamento por alta pressão, uma vez que tem demonstrado ser eficiente na inativação de micro-organismos a pressões moderadas (menores do que 200 bar), assegurando, por exemplo, a preservação de alimentos (Perrut, 2012; Spilimbergo, Elvassore e Bertucco, 2002). Quando uma substância é submetida a temperatura e pressão acima do seu ponto crítico, tem-se um fluido em estado supercrítico, cuja característica é se difundir como um gás (baixa tensão superficial) e ser denso como um líquido (Zhang *et al.*, 2006). O efeito inibitório de CO_2 supercrítico foi reportado pela primeira vez em uma publicação de Kamihira e colaboradores em 1987, em que tratamento com CO_2 supercrítico foi capaz de esterilizar amostras contendo levedura de panificação, *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* e conídio de *Aspergillus niger* a 200 atm e 35°C enquanto não foi observado efeito esterilizante com CO_2 líquido e gasoso. Além disso, foi observado que o conteúdo de água interno da célula tem um papel importante no processo de esterilização, uma vez que células secas (com menos que 10% de água) não foram inativadas pelo tratamento com CO_2 supercrítico (Kamihira *et al.*, 1987).

Segundo levantamento realizado por Garcia-Gonzalez *et al.* (2007) existem diversas hipóteses acerca do mecanismo de inativação do CO_2 pressurizado, que podem atuar simultaneamente sobre o micro-organismo. Dentre essas estão:

1. A solubilização do CO_2 pressurizado na fase líquida externa, o que leva à redução de pH pela formação e dissociação do ácido carbônico. Acredita-se que o baixo pH externo, além do intumescimento da parede celular causado pela presença da água, contribua para o aumento da permeabilidade celular e facilite a penetração do CO_2 no interior das células (Ho-mu, Zhiying e Li, 1993).
2. Modificação da membrana celular; em estudo utilizando sondas fluorescentes, Spilimbergo e colaboradores (2009) avaliaram, em tempo real, a permeabilização da membrana celular de *Sacharomyces cerevisiae* induzida por tratamento com CO_2 supercrítico em diferentes condições de operação. Demonstraram que o tratamento, após 10 minutos, com CO_2 causa danos irreversíveis à célula devido a modificações nas propriedades da sua membrana, tais como fluidez e permeabilização da camada fosfolipídica.
3. Redução do pH interno da célula; o CO_2 pressurizado tem sua penetração facilitada pelo aumento da permeabilidade da membrana e se acumula no interior no citoplasma de células bacterianas.
4. Inativação de enzimas chave e inibição do metabolismo devido à redução do pH; a atividade catalítica das enzimas sensíveis à redução do pH declina, uma vez saindo da faixa de pH ótimo.
5. Efeito inibitório direto provocado pela presença das moléculas de CO_2 e HCO_3^- no interior da célula; as espécies de CO_2 têm efeito sobre o metabolismo microbiano em função da importância de várias reações de carboxilação e descarboxilação.
6. Desequilíbrio do balanço eletrolítico; quando o CO_2 pressurizado é aplicado às células, há a liberação de bicarbonato convertido a carbonato, o qual pode causar a precipitação intracelular de cálcio, magnésio e íons similares, provocando danos letais à célula (Ho-mu *et al.*, 1993).
7. Remoção de constituintes vitais do interior da célula e da membrana celular. Uma vez que a densidade de CO_2 no interior da célula atinja um nível crítico, o CO_2 é capaz de extrair lipídios ou outros constituintes vitais para a célula, e causar distúrbios letais ou desequilibrar o seu metabolismo, inativando-a (Ho-mu *et al.*, 1993).

No processo de esterilização por CO_2 supercrítico, parâmetros como pressão, temperatura e tempo de tratamento determinam a eficiência do procedimento. Em geral, a temperatura é o fator de maior importância e sua eficácia é reduzida em temperaturas abaixo de 40°C. A pressão deve estar além do valor crítico, uma faixa de pressão mediana (80-150 bar) parece ser adequada. Além disso, ciclos de pressão rápidos aumentam a taxa de inativação. Já o tempo de exposição pode variar de acordo com a linhagem, a matriz e a temperatura e pressão (Perrut, 2012).

Se somente o tratamento com CO_2 supercrítico parece funcionar para formas vegetativas dos micro-organismos, para os esporos a combinação de tratamentos com o CO_2 supercrítico tem se mostrado mais eficiente (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2007; Perrut, 2012). No caso específico da inativação de esporos bacterianos e fúngicos, estes, em geral, não são afetados por CO_2 supercrítico a médias temperaturas (<60°C), mas esse tratamento associado a tratamentos em ciclos rápidos pode promover uma inativação parcial (Spilimbergo *et al.*, 2002). Além dessa estratégia, é possível uma inativação dos esporos mais eficiente ao associar o tratamento com CO_2 supercrítico ao uso de pré-tratamento com pulsos de campo elétrico (Sara Spilimbergo, Dehghani, Bertucco e Foster, 2003) e à adição de potentes oxidantes, tais como peróxido de hidrogênio ou terc-butil-hidroperóxido (Shieh, Paszczynski, Wai, Lang e Crawford, 2009).

Além de CO_2 supercrítico, outros gases pressurizados vêm sendo estudados quanto a sua eficiência na redução de micro-organismo viáveis, entre eles, N_2, N_2O, Ar e misturas entre N_2 e O_2 (Garcia-Gonzalez *et al.*, 2007). O uso de fluidos supercríticos a baixas temperaturas é especialmente interessante para a aplicação na inativação de vírus, os quais contaminam materiais provenientes de humanos, tais como frações de sangue/plasma, implantes de órgãos/tecidos, e até mesmo r-DNA, que são muito frágeis ao tratamento por agentes químicos, temperatura e irradiação (Perrut, 2012). No caso dos vírus, por exemplo, o CO_2 não tem sido considerado a melhor opção, em vez dele o N_2O supercrítico tem se mostrado eficiente contra a maioria das viroses, com maior eficiência na inativação de vírus envelopados, provavelmente devido à interação do gás com os lipídios presentes no envelope (Perrut, 2012).

Existem alguns estudos que avaliam a eficiência desta técnica de esterilização em produtos da área de alimentos, tais como sucos, molhos e passatas de tomate (Gasperi *et al.*, 2009; Parton, Elvassore, Bertucco e Bertoloni, 2007; Spilimbergo, Mantoan e Dalser, 2007). No caso da aplicação dessa técnica no produto naturalmente contaminado, é preciso

superar alguns desafios que podem impedir sua eficiência como em estudos laboratoriais. As razões para a existência desses desafios são: o acesso do fluido aos micro-organismos que pode ser dificultado pela matriz, compostos da matriz podem interagir com o processo de inativação, e/ou, mais provavelmente, a presença de esporos que são mais difíceis de inativar do que as células vegetativas (Perrut, 2012).

Revisão dos conceitos apresentados

Ao longo do texto foram introduzidos os conceitos básicos referentes aos métodos de desinfecção e esterilização, assim como os fatores dos quais dependerão a eficiência do método utilizado. Como principal objetivo deste capítulo tem-se a discussão dos principais métodos físicos (calor úmido, calor seco, pasteurização, radiação, microfiltração), e químicos (fenóis, biguanidas, alcoóis, halogênios, óxido de etileno, surfactantes, peróxidos e ozônio e aldeídos), destacando seu mecanismo de ação e suas aplicações mais indicadas. Outros métodos não convencionais, tais como plasma e fluídos supercríticos, foram também discutidos afim de abordar técnicas ainda em desenvolvimento e com aplicação restrita. Além dos métodos de desinfecção, o sistema “Cleaning-in-place” (CIP), um método de limpeza aplicado particularmente em processos industriais, também é abordado.

Tão importante quanto o conhecimento acerca dos métodos de esterilização e desinfecção é o conhecimento sobre a validação da eficiência destes métodos. Aparelhos e processos empregados em métodos físicos de esterilização e desinfecção devem ser submetidos a testes de validação específicos. Da mesma forma, os agentes químicos devem ter sua eficiência comprovada através da realização de uma bateria de testes preconizados por órgãos internacionais, como o Comitê Europeu de Normatização (CEN) e a Association of Official Analytical Chemists (AOAC).

Questões

1. Os métodos físicos de calor úmido e seco são muito utilizados para esterilização em bioprocessos, mas não para todos os tipos de materiais e nutrientes. Cite e explique quais são as exceções.
2. Por que os endoesporos bacterianos são tão resistentes?
3. Quais as vantagens e desvantagens em se utilizar um fluido supercrítico ao óxido de etileno em um bioprocesso?

4. O sistema “Cleaning-in-place” é um processo de esterilização? Explique.
5. Como verifico se um método físico de esterilização e desinfecção é eficiente? E um método químico?

Tópicos para discussão

- Discutir os prós e contras de cada método fisico de controle microbiano apresentado no capítulo.
- Discutir a importância do controle e monitoramento dos métodos e por que existem micro-organismos específicos para avaliá-los.
- Discutir as vantagens de se utilizar os métodos físicos de controle microbiológico nos dias de hoje e como foram importantes no passado.
- Em relação à validação dos agentes químicos de desinfecção, discutir as principais diferenças entre os métodos preconizados pelo CEN e pela AOAC.
- Discutir quais métodos químicos são mais eficientes em relação aos tipos de micro-organismos (bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, fungos, vírus) e suas formas (vegetativa e esporulada), procurando associar a algum tipo de aplicação industrial específico.
- Comparar o uso de fluidos supercríticos com outros métodos de alta pressão. E discutir os métodos combinados de fluidos supercríticos.

Referências

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N. 15, de 15 de março de 2012.

Agência Nacional de Vigilância Sanitaria (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada – RDC N. 17, de 16 de abril de 2010.

AOAC. Official Methods of Analysis AOAC International. 2000. 17th ed. Volume 1. Edited by Dr. Horwitz, W. Published by AOAC International. USA. Chapter 6. Disinfectants Subchapter 1. Phenol coefficient methods AOAC official methods 955.11.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à saúde. Coordenação geral das unidades próprias do Rio de Janeiro. Orientações gerais para central de esterilização, Série A, Normas e Manuais Técnicos, n. 108, Brasília, DF, Brasil, 2001.

Bremer PJ, Seale RB. Clean-in-Place. In: Flickinger MC, ed. *Downstream Industrial Biotechnology*. Hoboken: John Wiley & Sons; 2013.

Davis JM, Shade KL, Cell culture, aseptic techniques. Flickinger MC, ed. *Upstream Industrial Biotechnology: Expressions Systems and process development*, Vol. 1. New Jersey: John Wiley & Sons; 2013.

De Geyter N, Morent R. Nonthermal plasma sterilization of living and nonliving surfaces. *Annual Review of Biomedical Engineering*. 2012;14:255–274.

Dunford NT. *Food and industrial bioproducts and bioprocessing*. UK, Oxford: John Wiley-Blackwell; 2012.

Dutta R. *Fundamentals of Biochemical Engineering*. New Delhi: Anne Books India, Springer Inc; 2008.

Fraise AP. Choosing disinfectants. *Journal of Hospital Infection*. 1999;43(4):255–264.

García, L.A.; Díaz, M. Cleaning in Place. In: Moo-Young, M. 2011. Comprehensive Biotechnology. 2nd ed., Vol. 2 – Engineering Fundamentals of Biotechnology. Amsterdam: Elsevier.

Garcia-Gonzalez L, Geeraerd AH, Spilimbergo S, Elst K, Van Ginneken L, Debevere J, Devlieghere F. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: the past, the present and the future. *International Journal of Food Microbiology*. 2007;117(1):1–28.

Gasperi F, Aprea E, Biasioli F, Carlin S, Endrizzi I, Pirretti G, Spilimbergo S. Effects of supercritical CO2 and N2O pasteurisation on the quality of fresh apple juice. *Food Chemistry*. 2009;115(1):129–136.

Ho-mu L, Zhiying Y, Li FC. Inactivation of Leuconostoc dextranicum with carbon dioxide under pressure. *The Chemical Engineering Journal*. 1993;52(1):B29–B34.

Humphreys PN. Testing standards for sporicides. *The Journal of Hospital Infection*. 2011;77(3):193–198.

Humphreys PN, Finan P, Rout S, Hewitt J, Thistlethwaite P, Barnes S, Pilling S. A systematic evaluation of a peracetic-acid-based high performance disinfectant. *Journal of Infection Prevention*. 2013;14(4):126–131.

Junker BH. GMPs and GLSPs. In: Flickinger MC, ed. *Downstream Industrial Biotechnology: Recovery and Purification*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons; 2013.

Kamihira M, Taniguchi M, Kobayashi T. Sterilization of Microorganisms with Supercritical Carbon Dioxide. *Agricultural and Biological Chemistry*. 1987;51(2):407–412: Disponível em: http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00021369.1987.10868053.

Katoh S, Horiuchi J-I, Yoshida F. *Biochemical Engineering, A Textbook for Engineers, Chemists and Biologists*. 2nd ed. Weinheim, Alemanha: Wiley-VCH; 2015.

Lee PS. Quantitation of Microorganisms. In: Goldman E, Green LH, eds. *Practical Handbook of Microbiology*. 3rd ed. New York: CRC Press; 2015.

Lerouge S. Introduction to sterilization: definitions and challenges. In: Lerouge S, Simmons A, eds. *Sterilisation of biomaterials and medical devices*. UK, Oxford: Woodhead Publishing; 2012.

Levy RV. Sterile filtration of liquids and gases. In: Block SS, ed. *Disinfection, sterilization, and preservation*. Filadélfia: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.

Madigan MT, Martinko JM, Stahl DA, Clark DP. *Brock Biology of Microorganisms*. 13th ed. San Francisco: Benjamin Cummings; 2012.

Mancosky DG, Milly P. Controlled Cavitation for Scale-Free Heating, Gum Hydration and Emulsification in Food and Consumer Products. In: Feng H, Barbosa-Cánovas GV, Weiss J, eds. *Ultrasound technologies for food and bioprocessing*. New York: Springer; 2011: vol. 1.

Noble PT. Sterilization-in-Place. In: Flickinger MC, Drew SW, eds. *Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation*. New York: John Wiley & Sons; 1999.

Otto C, Zahn S, Rost F, Zahn P, Jaros D, Rohm H. Physical methods for cleaning and disinfection of surfaces. *Food Engineering Reviews*. 2011;3(3-4):171–188.

Parsons BJ. Sterilisation of healthcare products by ionising radiation: principles and standards. In: Lerouge S, Simmons A, eds. *Sterilisation of biomaterials and medical devices*. UK, Oxford: Woodhead Publishing; 2012.

Parton T, Elvassore N, Bertucco A, Bertoloni G. High pressure CO2 inactivation of food: A multi-batch reactor system for inactivation kinetic determination. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2007;40(3):490–496.

Payne DN, Babb JR, Bradley CR. An evaluation of the suitability of the European suspension test to reflect in vitro activity of antiseptics against clinically significant organisms. *Letters in Applied Microbiology*. 1999;28(1):7–12.

Pelczar MJ, Chan ECS, Krieg NR, eds. *Microbiology: Application Based Approach*. New Delhi: Tata McGraw-Hill; 2010.

Perrut M. Sterilization and virus inactivation by supercritical fluids (a review). *The Journal of Supercritical Fluids*. 2012;66:359–371.

Raju, G.K.; Cooney, C.L. 1993. Chapter 9 – Media and Air Sterilization. In: Rehm, H.-J.; Reed, G.; Pühler, A.; Stadler, P. Biotechnology. 2nd ed., vol.3 – Bioprocessing. Weinheim, Alemanha: VCH.

Reybrouck G. The testing of disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1998;41(3-4):269–272.

Reybrouck G. Antifungal Activity of Disinfectants. In: Fraise AP, Lambert PA, Maillard J-Y, eds. *Principles and Practice of Disinfetion, Preservation and Sterilization*. 4th ed. Oxford, UK: Wiley-Blackwell; 2004:205–249.

Ricoeur P. Regulatory compliance. In: Niazi SK, ed. *Disposable Bioprocessing Systems*. Flórida: CRC Press; 2011.

Roberts PL, Sterilization and decontamination, bioprocess equipament. Flickinger MC, ed. *Upstream Industrial Biotechnology: Expressions Systems and process development*, Vol. 1. New Jersey: John Wiley & Sons; 2013.

Rogers WJ. Steam and dry heat sterilization of biomaterials and medical devices. In: Lerouge S, Simmons A, eds. *Sterilisation of biomaterials and medical devices*. UK, Oxford: Woodhead Publishing; 2012.

Rosalie J, Cote RJ, Microbial media composition. Flickinger MC, ed. *Upstream Industrial Biotechnology: Expressions Systems and process development*, Vol. 1. New Jersey: John Wiley & Sons; 2013.

Rutala, W.A.; Weber, D.J. 2008. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, CDC.

Sandle T. *Sterility, sterilisation and sterility assurance for pharmaceuticals: Technology, validation and current regulations*. UK, Cmbridge: Woodhead Publishing; 2013.

Schmidell W, Lima UA, Aquarone E, Borzani W. *Biotecnologia Industrial. Vol. 2 – Engenharia Bioquímica*. São Paulo: Editora Edgard Blücher; 2001.

Schmidt MG. Sterilization, Disinfection, and Antisepsis. In: Goldman E, Green LH, eds. *Practical handbook of microbiology*. 3rd ed. New York: CRC Press; 2015.

Sella SR, Vandenberghe LP, Soccol CR. *Bacillus atrophaeus*: main characteristics and biotechnological applications-a review. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2014;(0):1–13.

Shieh E, Paszczynski A, Wai CM, Lang Q, Crawford RL. Sterilization of Bacillus pumilus spores using supercritical fluid carbon dioxide containing various modifier solutions. *Journal of Microbiological Methods*. 2009;76(3):247–252.

Spilimbergo S, Dehghani F, Bertucco A, Foster NR. Inactivation of bacteria and spores by pulse electric field and high pressure CO2 at low temperature. *Biotechnology and Bioengineering*. 2003;82(1):118–125.

Spilimbergo S, Elvassore N, Bertucco A. Microbial inactivation by high-pressure. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2002;22(1):55–63.

Spilimbergo S, Mantoan D, Dalser A. Supercritical gases pasteurization of apple juice. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2007;40(3):485–489.

Spilimbergo, S.; Mantoan, D.; Quaranta, A.; Mea, G. Della. 2009. Real-time monitoring of cell membrane modification during supercritical CO2 pasteurization. The Journal of Supercritical Fluids, 48(1): 93-97.

Stanbury PF, Whitaker A, Hall SJ. *Principles of Fermentation Technology*. 2nd ed. Burlington: Butterworth Heinemann, Elsevier Inc; 1995.

Tortora GJ, Funke BR, Case CL. *Microbiology: An Introduction*. 12th ed. San Francisco: Benjamin Cummings; 2016.

Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia*. 5ª ed. São Paulo: Atheneu; 2008.

Van Klingeren B, Koller W, Bloomfield SF, Böhm R, Cremieux A, Holah J, Rödger HJ. Assessment of the efficacy of disinfectants on surfaces. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 1998;41(3-4):289–296.

Vermelho AB. Métodos físicos e químicos de controle do crescimento microbiano. In: Vermelho AB, Pereira AP, Coelho RRR, Souto-Padrón T, eds. *Práticas de Microbiologia*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006.

Ward OP. *Bioprocessing*. New York: Springer Science; 1991.

Zhang J, Davis TA, Matthews MA, Drews MJ, LaBerge M, An YH. Sterilization using high-pressure carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2006;38(3):354–372.

CAPÍTULO 8

Introdução a Bioprocessos

Maria Alice Zarur Coelho

Nei Pereira Junior

Priscilla Filomena Fonseca Amaral

Conceitos apresentados neste capítulo

A Biotecnologia é um fator chave no desenvolvimento e implementação de processos para obtenção de novos produtos alimentícios e farmacêuticos, para alimentação animal e vários outros produtos específicos obtidos pela aplicação dos princípios da microbiologia, da tecnologia enzimática e da engenharia. Os principais aspectos que envolvem um bioprocesso incluem as características da matéria-prima, sendo possível encontrar substratos solúveis, pouco solúveis ou insolúveis, e as especificidades do biocatalisador, que pode ser um micro-organismo, células animais ou vegetais ou enzimas. É importante também levar em consideração as várias formas de condução do processo biotecnológico (batelada, batelada alimentada, contínuo etc.) em função das características do sistema (efeitos de inibição, nível de esterilidade, tipo de biocatalisador etc.) e do tipo de cinética do bioprocesso. Parâmetros cinéticos devem ser calculados para se identificar a influência de diferentes fatores e, assim, obter as melhores condições para elevadas produtividades, rendimentos e eficiência. A escolha do biorreator e seus acessórios é também essencial para o sucesso do bioprocesso e o tipo de mistura, o tipo e a forma do biocatalisador e a configuração do equipamento influenciam bastante na conversão e produtividade. Não se pode deixar de lado as etapas de tratamento da matéria-prima e preparo do meio (etapas de *upstream*) e de separação e purificação do produto (etapas de *downstream*), pois as mesmas influenciam todo o processo. Todos esses conceitos são abordados neste capítulo levando em consideração os aspectos

fisiológicos e metabólicos dos micro-organismos de forma a conferir ao leitor uma visão geral de um bioprocesso típico.

8.1. Introdução

O objetivo primário da prática da Engenharia Química, da Engenharia Bioquímica, Engenharia de Alimentos e da Química Industrial é a criação/otimização de processos que economicamente transformem a matéria-prima em produtos comercializáveis, usando conhecimentos científicos e tecnológicos.

Bioprocessos compreendem um conjunto de operações que efetuam o tratamento da matéria-prima, o preparo dos meios de propagação e produção, a esterilização, se assim o processo demandar, e a transformação do substrato em produto(s) por rota bioquímica, seguida de processos de separação e purificação de produto(s). Um esquema simplificado de um Bioprocesso é mostrado na Figura 8.1.

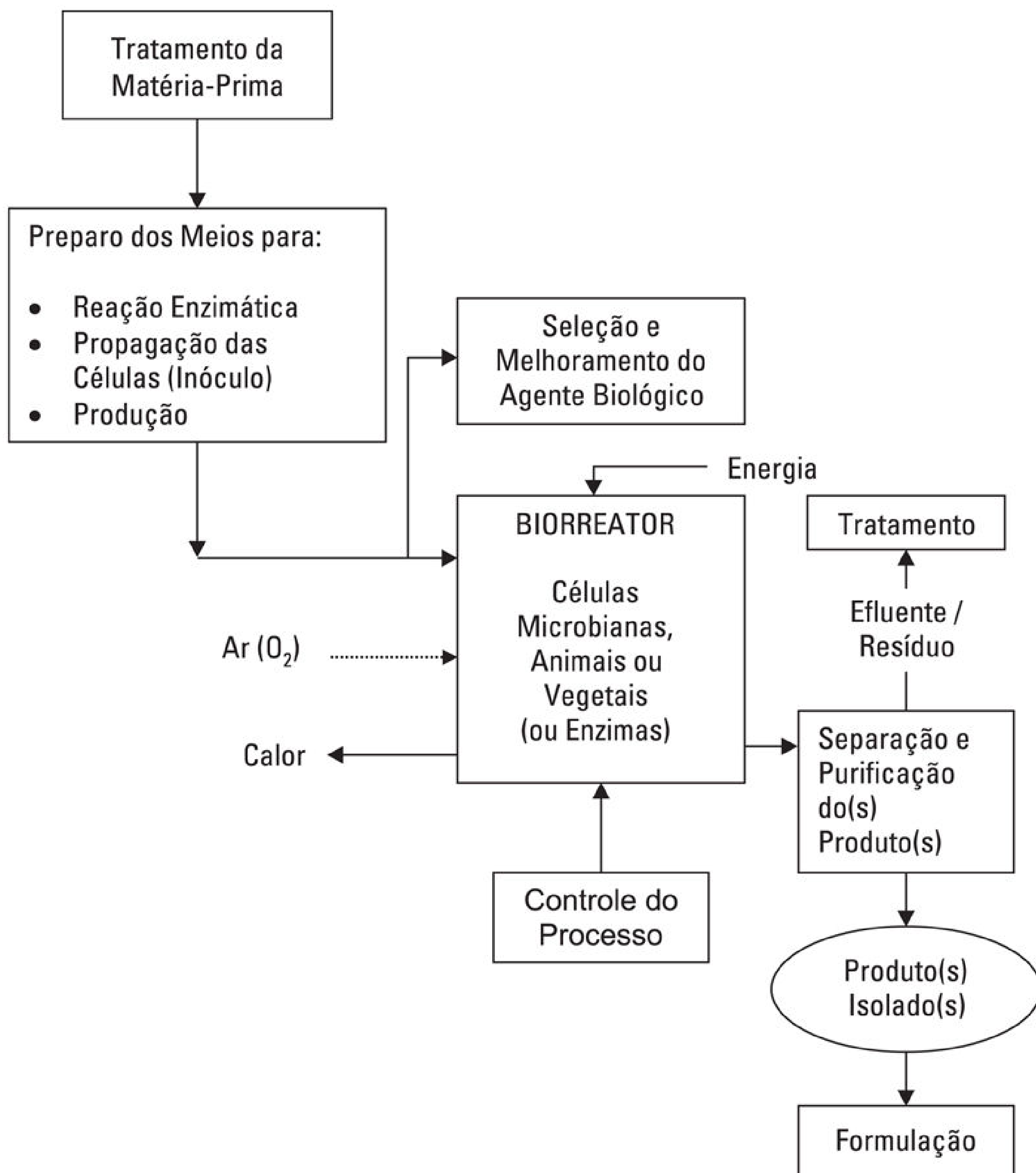


FIGURA 8.1 **Esquema simplificado de um bioprocesso.**

A distinção entre Bioprocessos e Processos Químicos está calcada na natureza dos catalisadores utilizados em suas reações. Os Bioprocessos são conduzidos mediante ação de micro-organismos, células animais ou vegetais, ou, ainda, de substâncias produzidas por estes agentes, sendo as transformações catalisadas enzimaticamente. Por outro lado, os processos químicos envolvem a presença de um catalisador químico, que é bem menos específico e, geralmente, exige condições drásticas de temperatura e

pressão. Esta importante diferença define o caráter inter e multidisciplinar da Biotecnologia, necessitando aqueles que militam nesta área de conhecimentos fundamentais em Bioquímica, Genética, Microbiologia Aplicada e Engenharia Bioquímica, a fim de terem maior compreensão sobre a atividade do biocatalisador e buscar melhores condições de desempenho em biorreator. Outras ferramentas como a Modelagem e a Simulação, bem como o Controle e a Instrumentação são peças-chave na otimização de Bioprocessos.

Outra característica altamente importante dos processos biotecnológicos é que estes empregam, via de regra, matérias-primas renováveis e seus rejeitos são de baixa toxicidade e, portanto, facilmente tratados. Um exemplo clássico é a comparação entre os biocombustíveis (etanol combustível, por exemplo) e os combustíveis fósseis. Para o etanol combustível, o gás carbônico proveniente da produção e combustão do álcool é reabsorvido em parte através do processo da fotossíntese, ao passo que o gás carbônico oriundo da combustão de derivados de petróleo acumula-se na atmosfera, contribuindo para o aumento do efeito estufa.

A seguir abordar-se-á os principais aspectos de um bioprocesso, descrevendo características do biocatalisador, matérias-primas, preparo do(s) meio(s), biorreator(es) e separação e purificação de produto(s).

8.2. Matérias-primas

Uma grande variedade de matérias-primas, geralmente provenientes da agroindústria, são utilizadas como fontes de substratos e outros nutrientes. De uma forma geral, as matérias-primas para bioconversões podem ser agrupadas em função de estrutura e complexidade molecular dos substratos. Em algumas, o(s) substrato(s) encontra(m)-se na forma polimérica, e sua hidrólise será necessária caso o agente biológico não seja capaz de sintetizar enzimas a fim de se levar a cabo sua despolimerização. Assim, estas matérias-primas podem conter:

- Substratos solúveis que podem ser facilmente extraídos e convertidos prontamente em produto(s), como, por exemplo: sacarose, glicose, frutose e lactose, de cana de açúcar, beterraba, melaço, soro de leite, etc. As matérias-primas contendo esse tipo de substrato são chamadas sacaríneas e, geralmente, os substratos, que são mono ou dissacarídeos, são diretamente utilizados pelos micro-organismos.
- Polissacarídeos insolúveis, que precisam de tratamento moderado para solubilização e hidrólise, antes da conversão em produto(s) como, por exemplo: amido de milho, mandioca, trigo, cevada, batata, etc. Como o substrato, nesse caso, é o amido, as matérias-primas são chamadas amiláceas.
- Polissacarídeos insolúveis altamente resistentes, que necessitam de pré-tratamento físico, seguido de hidrólise química ou enzimática para produzir substratos na forma monomérica, que serão convertidos em produto(s), como, por exemplo: celulose e hemicelulose de matérias-primas lignocelulósicas.

Obviamente que, quando se avalia a utilização dessas matérias-primas, existem aspectos particulares que devem ser levados em consideração, por estarem relacionados com viabilidade técnica, balanços energéticos e economicidade do bioprocesso em desenvolvimento.

Há que se ressaltar, que a matéria-prima é um dos componentes mais relevantes nos custos de produção, havendo casos em que pode representar até 75% dos custos totais, sendo esta uma das razões do crescente interesse no aproveitamento de resíduos agroindustriais e florestais como matérias-primas para uma grande gama de bioconversões.

Em determinados processos, como a produção de enzimas em meio semissólido, podemos prescindir dos pré-tratamentos intensivos em energia e, consequentemente, onerosos, já que muitos micro-organismos

têm a habilidade de atacar o complexo contendo o(s) polissacarídeo(s) e outras macromoléculas na sua forma íntegra.

8.3. Preparo de meios

Os meios de propagação e produção devem conter os nutrientes (fonte de carbono, fonte de nitrogênio, cofatores, precursores, elementos traços) em concentrações otimizadas, não sendo, necessariamente, as condições ótimas para o crescimento da célula microbiana, as mesmas para o processo produtivo.

A escolha dos nutrientes adequados à geração do produto de interesse está relacionada com a atividade metabólica desenvolvida pelos micro-organismos. Nesse ponto destaca-se a importância das informações obtidas sobre as exigências nutricionais da população microbiana envolvida no processo. Busca-se as fontes adequadas que possuam os componentes necessários ao bom desempenho do micro-organismo. Assim, há que se fortificar a matéria-prima com componentes que faltam, retirar aqueles que inibem, de modo a permitir uma rápida e eficiente conversão do substrato em produto com o rendimento desejado.

Quando o agente biológico for enzimas, há que se ter em mente que a atividade e a estabilidade enzimáticas são fortemente dependentes da força iônica do meio, temperatura, pH e da relação entre a concentração de substrato e de enzima. Estas variáveis básicas influenciam o desempenho do biocatalisador por afetarem as conformações das enzimas, estejam elas livres ou imobilizadas. Estudos devem ser conduzidos previamente a fim de se eleger as condições ótimas para a catálise enzimática.

Há bioprocessos bastante exigentes quanto à esterilidade dos meios de cultivo, havendo, também, grande rigor asséptico não só no transporte do meio esterilizado ao biorreator, bem como no próprio sistema reacional. Pode-se citar como exemplos de processos que demandam esterilização: a produção de antibióticos, vacinas, vitaminas e enzimas. Por outro lado, outros requerem apenas uma esterilização incipiente (pasteurização), tendo em vista que o próprio produto age como uma barreira à contaminação, devido ao seu caráter tóxico aos micro-organismos contaminantes. A bioprodução de combustíveis, solventes e ácidos orgânicos insere-se neste último caso. Há, também, bioprocessos em que se prescinde totalmente de assepsia, como é o caso dos biotratamentos, nos quais a microbiota nativa é extremamente desejável no processo.

Existem várias formas de se esterilizar meio e biorreator por agentes físicos, como, por exemplo: filtração através de membranas microporosas, radiação UV, calor úmido à pressão atmosférica ou saturado sob pressão.

Esta última, a forma mais usual, pode ser realizada em conjunto ou separadamente do biorreator e, ainda, em batelada ou continuamente.

O meio preparado deve, então, sofrer a ação dos biocatalisadores, seja pela inoculação de uma suspensão suficientemente concentrada de células ativadas e propagadas, seja recicladas ao processo, através da adição de unidades de atividades enzimáticas suficientes para se levar a cabo a transformação do substrato em produto, com altas conversões e altas taxas de produção.

8.4. Biocatalisadores

O biocatalisador (micro-organismo, célula animal, vegetal ou enzima), deve ser selecionado em função das seguintes propriedades: elevada atividade ou potência, ou seja, ser capaz de converter rapidamente o(s) substrato(s) em produto(s) com altos rendimentos, conduzindo a altos valores de produtividade; estabilidade sob condições ambientais extremas (elevada pressão osmótica do meio, elevada temperatura, elevada força iônica), mantendo sua constância biológica e sendo tolerante e resistente a substâncias tóxicas, que podem ser geradas no processo de tratamento da matéria-prima ou encontradas em resíduos e efluentes. Técnicas da biologia molecular e da engenharia metabólica vêm sendo utilizadas para maximizar essas propriedades desejáveis em um biocatalisador.

Durante as últimas décadas, os micro-organismos têm surgido como parte do eixo principal das ciências biológicas. Entre as razões para isto está o conceito de unidade em bioquímica, que significa que muitos processos bioquímicos que ocorrem em micro-organismos são essencialmente os mesmos em todas as formas de vida, inclusive no homem. Em virtude da relativa simplicidade em realizar experimentos com micro-organismos, associada à rápida velocidade de crescimento e de sua variedade de atividades bioquímicas, os micro-organismos tornaram-se o modelo experimental de escolha para o estudo da genética. Atualmente, eles são extensivamente utilizados na investigação de fenômenos biológicos fundamentais. Os micro-organismos têm também emergido como novas fontes de produtos e processos para o benefício da sociedade.

A Microbiologia está relacionada com todos os aspectos dos micro-organismos: sua forma, citologia, nutrição, reprodução, genética, atividade bioquímica, classificação e identificação. Ela estuda sua distribuição e atividade na natureza, sua relação com outros organismos e sua habilidade de causar alterações físicas e químicas no ambiente.

Portanto, conhecer sobre as características/propriedades dos micro-organismos que tanto são utilizados na Biotecnologia levará a inúmeras vantagens no desenvolvimento de bioprocessos industriais.

Pode-se começar então reconhecendo um micro-organismo pelas suas características morfológicas. É claro que a forma define o ser biológico em estudo e mais que isso, pelo conhecimento da constância ou da variação morfológica pelas quais passam o organismo de interesse, é possível reconhecer quando o processo está sendo bem ou mal conduzido. Um

processo estável determina a geração de produtos também estáveis e com igual qualidade como consequência da estabilidade apresentada pela morfologia biológica. As informações sobre a morfologia microbiana são também auxiliares e indicativos potenciais da evidenciação de contaminação do sistema, permitindo importantes tomadas de decisão.

É importante também que as informações citológicas sejam estudadas a fim de se determinar com precisão quais das estruturas celulares serão resguardadas para a obtenção da atividade metabólica de interesse. Muitas vezes o produto de interesse que está localizado numa determinada estrutura, ou sua síntese, é dependente do bom funcionamento da mesma.

De todos os organismos vivos, os micro-organismos são os mais versáteis e diversificados em suas exigências nutricionais. O cultivo em laboratório é necessário para caracterizar suas propriedades e determinar seu crescimento, bem como monitorar as conversões biológicas. Uma variedade de nutrientes é utilizada para os fins acima referidos, incluindo carbono, nitrogênio, enxofre, fósforo, hidrogênio, oxigênio, vitaminas e sais minerais.

É evidente que quanto maior o atendimento às exigências nutricionais, mais apto estará o micro-organismo a responder aos estímulos externos. Consequentemente, mais eficiente será a conversão do produto de interesse e maior a produtividade. Satisfazer as exigências nutricionais microbianas ou compor adequadamente o meio de cultivo em laboratório, cujas dimensões dos biorreatores são pequenas, pode ser muito fácil, empregando-se nutrientes puros e caros. No entanto, para compor o meio industrial da fermentação, alguns nutrientes deverão ser selecionados de acordo com suas características não só nutricionais como econômicas, não podendo ser esquecidas as particularidades inerentes ao micro-organismo agente do processo, quanto ao que será aproveitado para suas reações metabólicas ou a algum efeito de inibição sobre essas reações ou sobre o produto final.

Tão importantes quanto as condições nutricionais são as condições culturais, que determinam as condições necessárias para que os nutrientes presentes no meio de cultura sejam absorvidos e transformados pelos micro-organismos. Essas condições, da mesma forma que as reações químicas, referem-se ao pH, à temperatura e à presença de oxigênio. Não se pode esquecer que os micro-organismos na verdade efetuam suas atividades através de um conjunto de enzimas que exigem condições ótimas para a catálise. Portanto, condições nutricionais e culturais, diferentes para organismos e produtos diferentes, devem ser mantidas e respeitadas para o bom andamento do sistema operacional.

Industrialmente, o resultado da manutenção dessas condições implica dispor de recursos para o controle das mesmas.

Os micro-organismos utilizados nos processos industriais devem ser adequadamente preservados e conservados como cultura pura. Através de diferentes técnicas é possível manter todas as características da população microbiana de interesse e, dessa forma, sempre que nova produção é iniciada, a qualidade do produto também é mantida.

Após procedimento de inoculação, a célula desenvolve seu metabolismo, a fim de produzir energia para suportar suas reações biossintéticas e de manutenção energética. As moléculas-combustíveis (carboidratos, lipídios, proteínas) utilizadas pela célula contêm elevado nível de energia química, devido ao seu alto grau de ordem estrutural, apresentando, relativamente, baixa entropia. Durante o catabolismo essas substâncias são degradadas a moléculas menores, como dióxido de carbono, água, álcoois, etc. Como resultado dessa transformação, a molécula-combustível sofre uma perda de energia livre (forma de energia capaz de realizar trabalho a temperatura e pressão constantes). A energia livre liberada durante as reações do catabolismo e, por isso, chamada de exergônica, é conservada na forma de energia química nas ligações covalentes de certos compostos.

Os processos biossintéticos (anabolismo), transporte ativo através da membrana e mobilidade celular, envolvem reações endergônicas (carentes de energia). As células têm suas necessidades atendidas através da energia produzida durante o catabolismo.

Muitas células vivas necessitam de oxigênio para manutenção de seu metabolismo. Nos bioprocessos conduzidos com micro-organismos aeróbios, o oxigênio é suprido ao biorreator, via de regra, com bolhas de ar, através de um compressor. Já nos bioprocessos anaeróbicos, os micro-organismos obtêm o oxigênio metabólico através de substâncias que contêm oxigênio ligado molecularmente. Nos primeiros, o adequado suprimento de oxigênio para atender a demanda da célula é imperativo, assim como a manutenção de condições anaeróbicas estritas no segundo caso. Se essas exigências não forem atendidas o processo encontra-se com seu potencial limitado, podendo haver desvios no metabolismo celular ou mesmo sua interrupção, com a consequente morte da célula.

Dentro da concepção de processo integrado e racionalizado, a associação de determinadas características do biocatalisador, bem como das propriedades do sistema reacional com os processos de *downstream* (separação do biocatalisador e do produto), tem sido também uma tendência no desenvolvimento e operacionalidade de bioprocessos. Assim,

se o agente biológico do processo for um micro-organismo portador de propriedades agregativas (floculação), poder-se-á suprimir equipamentos onerosos de separação de células, e utilizar novas configurações de biorreatores mais compactos e menos intensivos em energia, tornando o processo, consequentemente, mais econômico. Associações de sistemas reacionais com separação simultânea de produtos podem, também, ser desenvolvidas (imobilização de enzimas em suportes de colunas cromatográficas, sistemas de fermentação acoplados a módulos de membrana, a destilação a vácuo, ou a sistemas extrativos bifásicos) com os consequentes benefícios para o bioprocesso.

A mistura reacional constituída de meio de cultivo (fermentação) e micro-organismos será então processada em biorreatores, onde há que se manter as condições ideais para o micro-organismo expressar o máximo de sua atividade metabólica.

8.5. Biorreator

No biorreator, vários fenômenos químicos, físicos e, naturalmente, biológicos ocorrem. Por essa razão, o desenvolvimento de bioprocessos constitui-se numa das mais complexas e fascinantes áreas de atuação da Engenharia Química e da Química Industrial. Por exemplo, no projeto de um biorreator, devem ser levados em consideração os seguintes aspectos: a cinética microbiana (ou enzimática), o cálculo das tubulações e equipamentos necessários para manutenção de esterilidade, as características hidrodinâmicas do meio de fermentação, a transferência de massa de nutrientes na célula, a transferência de massa de oxigênio da fase gasosa para o seio do líquido e, posteriormente, para as células (em processos aerados), a transferência de massa de produtos e subprodutos das vizinhanças das células para o seio do mosto, a transferência de calor metabólico e o controle da fisiologia microbiana.

Pode-se encontrar uma variedade formidável de configurações de biorreatores. Dentre elas, os biorreatores agitados mecanicamente (STB – Stirred Tank Biorreactor) são, sem dúvida, os mais estudados e utilizados industrialmente (Figura 8.2). Apesar de sua flexibilidade, pois podem ser empregados para uma grande gama de bioconversões, os biorreatores do tipo STB apresentam certas desvantagens, como, por exemplo: demandam grande aporte de energia para a agitação mecânica, tendem a afetar a morfologia microbiana, são de difícil escalonamento e têm de ser cuidadosamente projetados para produzir adequada mistura e aeração.

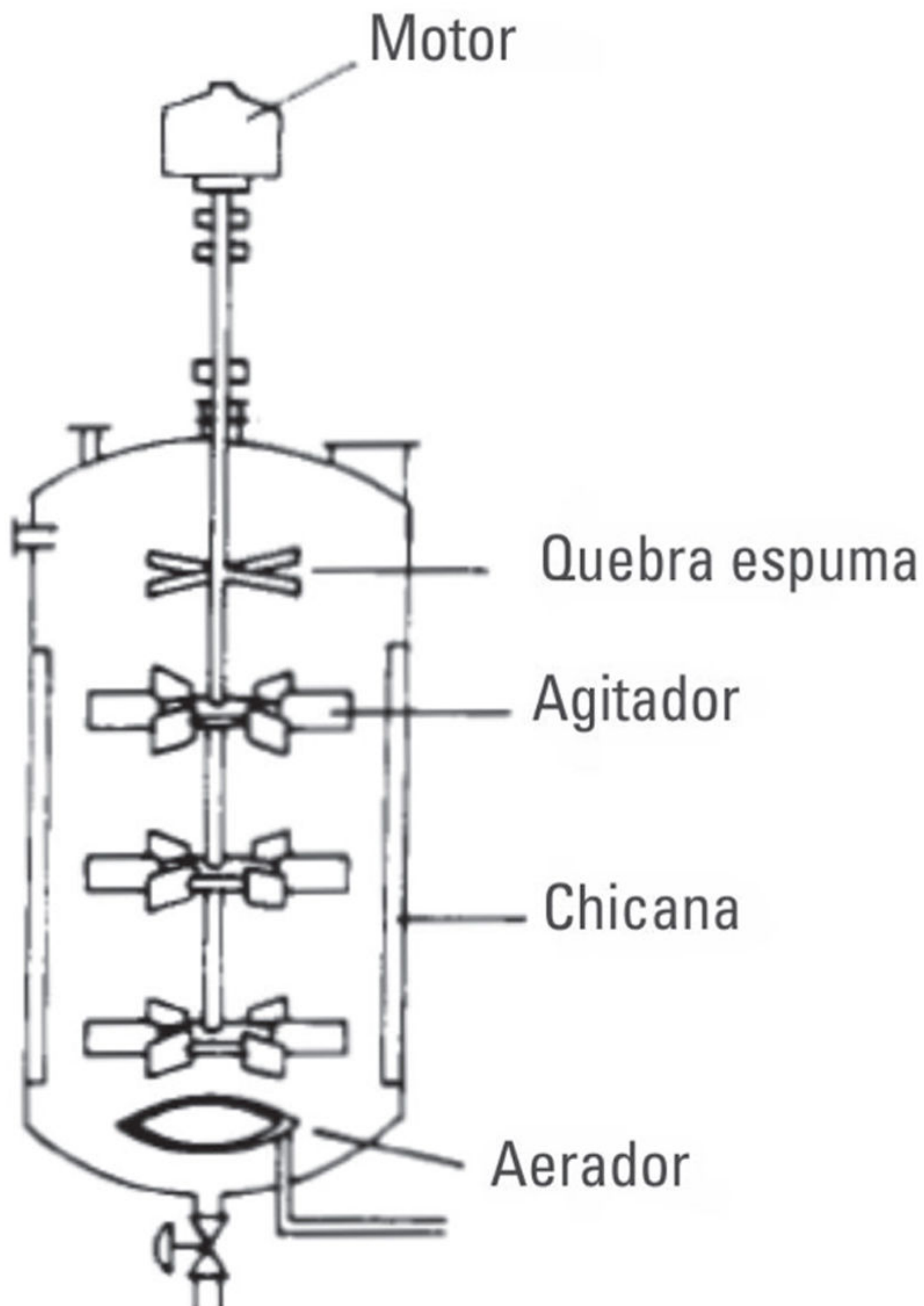


FIGURA 8.2 **Biorreator agitado mecanicamente.**

Nos biorreatores agitados pneumaticamente, a potência necessária para se atingir o grau de mistura desejável no sistema reacional a fim de se produzir altas taxas de transferência de massa e calor é suprida pela energia cinética do líquido, através de sua circulação por uma bomba, causada pelo movimento de bolhas gasosas, isto é, pneumaticamente. Este tipo de biorreator, conhecido na literatura inglesa como *airlift* (com circulação interna ou externa) ou *bubble column*, são aplicados a sistemas biológicos suscetíveis às forças cisalhantes, tão intensas em biorreatores agitados mecanicamente. Além da sua elevada relação altura:diâmetro (6:1 a 10:1), quando comparado com os biorreatores do tipo STB, os biorreatores agitados pneumaticamente possibilitam a operação contínua do bioprocesso com altas densidades celulares (morfologia floculante), resultando em altos valores de produtividade volumétrica. Há registros na literatura de processos que tiveram seus tempos de conversão de substrato em produto reduzidos de dias para horas, pelo emprego deste tipo de biorreator.

Biorreatores de membrana de ultrafiltração (*hollow-fiber* e *flat-sheet*) vêm, também, sendo utilizados com sucesso, em determinados bioprocessos. Sua principal vantagem está na possibilidade de confinar células ou enzimas dentro do biorreator, separando-as das correntes de alimentação e de saída do sistema e tornando esta etapa desnecessária durante o processo de *downstream*. Embora, esta vantagem possa ser também conseguida com outras técnicas de imobilização, o confinamento de células em biorreatores de membrana microporosa é, talvez, a maneira mais inócua de imobilização de células e enzimas, pois não são utilizados agentes químicos nem condições drásticas de aprisionamento. O uso de biorreatores de membrana é particularmente atraente em sistemas bifásicos, pois muitas dificuldades associadas com emulsificação e separação de fases podem ser evitadas.

Nas últimas duas décadas houve grandes e rápidos desenvolvimentos no uso de enzimas e micro-organismos para propósitos industriais, analíticos e médicos. A fim de tornar seu uso mais conveniente, enzimas e micro-organismos têm sido imobilizados, assemelhando-se aos catalisadores de fase sólida da química convencional. Células (vivas ou mortas) e enzimas podem ser imobilizadas por vários métodos. Em princípio, estes métodos são classificados em duas categorias: imobilização ativa ou passiva. A imobilização ativa requer o uso de agentes químicos, que ativarão a superfície do suporte ou possibilitarão a criação de uma matriz porosa, na qual o agente biológico fique aprisionado, enquanto que a imobilização passiva ocorre quando filmes biológicos ou flocos de células

aderem naturalmente na superfície ou no interior de um suporte inerte, sendo essas interações mediadas por forças eletrostáticas. A Figura 8.3 ilustra os métodos de imobilização de agentes biológicos.

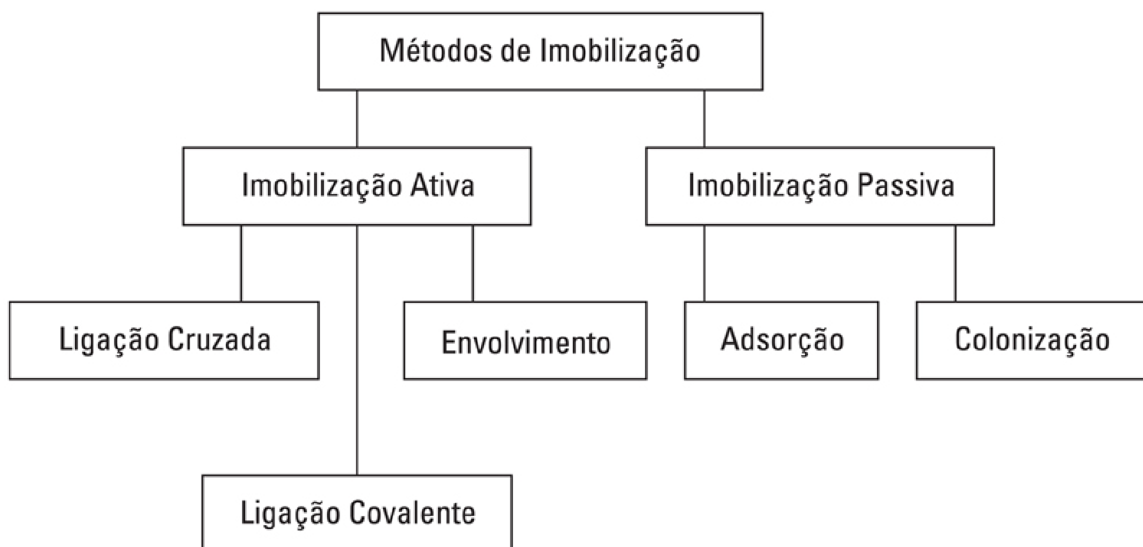


FIGURA 8.3 **Métodos de imobilização.**

Os tipos de biorreatores mais comumente utilizados em sistemas imobilizados são: CSTB (Continous Stirred Thank Bioreactor), leito fixo e leito fluidizado, sendo os dois últimos mais indicados por minimizarem a exposição da biopartícula (agente biológico imobilizado) a elevados graus de cisalhamento e colisões. Para se aplicar esta técnica em processos industriais, estudos devem ser realizados para elucidar algumas características dos sistemas imobilizados, principalmente no tocante à fisiologia celular, conformação da enzima imobilizada e aos problemas de transferência de massa intraparticular e do próprio biorreator (Figura 8.3). No entanto, esses sistemas vêm sendo utilizados industrialmente em diversos países, com sucesso na produção de etanol (combustível e champanhe), acrilamida, alanina e dos ácidos orgânicos: aspártico, málico e fumárico.

Configurações de biorreatores têm sido também propostas para o cultivo de células animais (livres ou imobilizadas/ancoradas). Estes sistemas requerem cuidadosa análise para a seleção/projeto de biorreatores, tendo em vista a ausência de parede celular nestas células, o que as torna muito mais suscetíveis às forças cisalhantes do que outros organismos e, por conseguinte, rompem-se com mais facilidade. Este problema é agravado pelo tamanho relativamente grande dessas células e

pela falta de mobilidade individual. Células animais ancoradas em microcarreadores não sofrem movimentos de rotação nem translação, consequentemente, não podem reduzir (amortizar) o impacto das forças decorrentes de sua exposição às forças mecânicas transferidas ao fluido. O cultivo de células animais em biorreator tem sido considerado um dos grandes desafios da biotecnologia moderna.

O cultivo de células vegetais em biorreator é também um dos assuntos em voga na biotecnologia moderna. O interesse comercial nestes cultivos está relacionado com a produção de metabólitos secundários de alto valor agregado, com aplicação na agricultura (inseticidas) e, em especial, nas áreas farmacêutica e médica, como, por exemplo: analgésicos, anestésicos e outros fármacos utilizados no combate a desordens circulatórias e cardíacas, malária, leucemia e etc. A opção pelo cultivo em biorreator deve-se à maior facilidade no controle da fisiologia dessas células, o que permite maximizar rendimentos e produtividades. Os avanços da biologia molecular, da engenharia metabólica e da engenharia bioquímica indicam que o sucesso comercial de tais bioprocessos não está distante de realização. Este é outro campo para grandes desenvolvimentos, assim como o desenvolvimento de fotobiorreatores.

8.6. Operação de bioprocessos

8.6.1. Condução de bioprocessos

A forma mais utilizada de condução de bioprocessos é a batelada simples. O principal problema desta forma de operar os bioprocessos é decorrente de fenômenos de inibição pelo substrato, produto, ou outros metabólitos. Por exemplo, elevadas concentrações de substrato são inibitórias ao agente biológico. Este efeito está relacionado, em células vivas, a fenômenos osmóticos que resultam em plasmólise celular. As possíveis razões para o fenômeno são: desidratação dos sistemas enzimáticos, devido à perda de água da célula e/ou inibição do transporte de nutrientes para o seu interior. É fato bem conhecido que a célula viva polui seu ambiente com produtos do seu metabolismo até cessar o crescimento e, eventualmente, perder sua viabilidade, fenômeno conhecido como inibição pelo produto. Ressalta-se que esses fenômenos são dependentes da linhagem e do meio ambiente.

Para se contornar esses problemas de inibição/repressão, outras formas de condução podem ser utilizadas, como a batelada alimentada e suas variantes, que possibilitam a manutenção da concentração desses inibidores/repressores em níveis subinibitórios/subrepressores, com implicações diretas no desempenho do biocatalisador. A técnica de batelada alimentada é definida como um modo de operação no qual um ou mais nutrientes necessários ao crescimento celular são adicionados ao biorreator, intermitentemente ou continuamente, sem que ocorra retirada de material durante a operação. A flexibilidade de operação oferecida por esta forma de condução é adequada a Bioprocessos em que o crescimento celular e/ou formação de produtos são significativamente sensíveis à concentração do substrato limitante. Técnicas de fermentação em batelada alimentada são adotadas para a produção de várias enzimas e antibióticos, uma vez que a formação destas biomoléculas é muitas vezes sujeita à repressão pelo substrato.

A condução contínua é outra modalidade de se operar os biorreatores. Sua principal vantagem, quando comparada com outras formas de condução, está ligada à possibilidade de operar o sistema por extensos períodos de tempo, resultando em aumento de produtividade. Adicionalmente, o agente biológico converte substrato em condições estacionárias, que podem ser determinadas previamente para o seu melhor desempenho, em contraste com a batelada simples, na qual o agente

biológico está submetido, a todo momento, a condições ambientais diferentes. Os processos contínuos podem ser conduzidos com um único biorreator (com e sem reciclo de células) e com biorreatores em série. As seguintes vantagens da condução contínua podem ser apontadas: inexistência de tempos improdutivos, levando o biorreator a permanecer muito mais tempo em serviço; as operações que antecedem e sucedem o processo podem ser realizadas continuamente; possibilidade de instrumentação e controle automáticos, levando a menores gastos com mão de obra; maior uniformidade do produto; e as condições ambientais são constantes, o que possibilita o estudo das várias influências sobre o agente do bioprocesso. No entanto, riscos de contaminação e problemas ligados à degenerescência do agente (mutação e variação) são citados como desvantagens da condução contínua.

A eleição da forma de condução será função da cinética do processo, tendo-se que avaliar o momento em que a síntese do produto se inicia. Assim, em que pesem as complexidades dos bioprocessos, estes podem apresentar a síntese do produto de forma associada, semiassociada e não associada ao crescimento microbiano. Pelo estudo cinético, pode-se orientar no projeto do processo que melhor convém ao biossistema. Assim é que os produtos que se formam associadamente ao crescimento podem ser processos conduzidos continuamente. Já no caso de produtos que têm a sua síntese de forma não associada ao crescimento, a distinção de duas fases orienta no sentido de realizar a produção do agente separadamente, tendo até um meio de composição diferente do de produção. O processo deverá, portanto, ser operado em duas fases e, dessa forma, nem sempre passível de ser conduzido continuamente. Conclusões análogas à anterior aplicam-se aos processos que apresentam cinética mista (semiassociada).

8.6.2. Desenvolvimento do biocatalisador

Bioprocessos podem ainda ser operados em superfície, em profundidade (submerso) e por fermentação no estado sólido. Os processos em superfície são aqueles em que a biomassa (massa de células) situa-se na superfície do meio líquido, em contato direto com o ar atmosférico, que fornece o oxigênio necessário à população celular. O meio de cultivo é colocado em recipientes rasos, de modo a oferecer grande área ao desenvolvimento do agente.

A diminuição da concentração de nutrientes nas camadas superficiais faz com que cheguem à superfície, por difusão, os nutrientes existentes nas camadas mais profundas. Também, por difusão, o(s) produto(s) do

metabolismo se dispersa(m) no meio em fermentação. Pelo exposto, a difusão e a relação entre a área oferecida e o volume de meio desempenham papel importante no estudo de bioprocessos operados em superfície. Este tipo de Bioprocesso limita-se, via de regra, aos fungos filamentosos, que tendem a formar película micelial na superfície do meio. No entanto, registra-se a produção clássica de vinagre pelo processo Orleanense, que é realizado por determinadas espécies de bactérias aeróbicas do gênero *Acetobacter*. Pelo fato de as taxas de transferência de massa de nutrientes serem reduzidas, os tempos de fermentação são consideravelmente longos. Adicionalmente, os processos em superfície são de difícil operacionalidade e considerados antieconômicos, pois resultam em alto custo de produção devido à custosa manipulação com esterilização (incluindo ambiente), enchimento, esvaziamento e limpeza das várias bandejas necessárias à produção em larga escala.

Os processos submersos são aqueles em que a célula produtora se desenvolve no seio do meio de cultivo, geralmente agitado, e, no caso de fermentações aeróbicas, o oxigênio necessário à população em desenvolvimento é suprido, através de um compressor, por borbulhamento de ar no líquido. Comparados com os processos em superfície, os processos submersos oferecem uma série de vantagens, como, por exemplo: podem ser manipulados com maior facilidade, maiores volumes de meio, facilitando a sua operacionalidade; a massa de células responsáveis pela transformação fica totalmente submersa no meio nutriente uniforme, que pode ser ajustado para fornecer as condições ideais de crescimento e produção. Absorção de nutrientes e excreção de metabólitos são realizadas com maior eficiência, levando a menores tempos de processo e, consequentemente, ganha-se em produtividade. Atualmente, a maioria das fermentações industriais importantes é realizada por processo submerso. Pode-se citar que uma determinante na redução no preço de muitos produtos, anteriormente obtidos por processos em superfície, foi a possibilidade de adaptá-los aos processos submersos. O exemplo clássico é, novamente, a produção de penicilina que teve seu processo de produção modificado nos idos de 1940. O desenvolvimento da tecnologia de fermentação submersa para a produção de antibióticos foi logo adotado pela indústria de enzimas e, hoje, a maioria delas é produzida por este processo.

A fermentação no estado sólido é definida como um processo no qual o crescimento microbiano e a formação de produto ocorrem na superfície de substratos sólidos e na ausência de água livre, diferentemente da fermentação submersa e em superfície, em que, via de regra, o(s)

substrato(s) e outros nutrientes encontram-se na sua forma solúvel. Substratos tradicionalmente utilizados constituem-se de produtos agrícolas como o arroz, o trigo, o painço, a cevada, o milho e a soja, além de substratos não convencionais como os resíduos agroindustriais e florestais, destacando-se: o bagaço de cana-de-açúcar, o sabugo de milho, o farelo de trigo e a palha de arroz. Estes resíduos têm despertado grande interesse da comunidade científica e industrial, pela possibilidade de seu uso como matérias-primas para bioconversões, o que é corroborado pelo número crescente de publicações neste tema. O grande interesse decorre do fato de essas matérias-primas não possuírem custos de produção associados diretamente, sendo uma forma de se agregar valor a resíduos que se formam em abundância nos setores agroindustriais. Adicionalmente, dá-se solução para o acúmulo dessas biomassas residuais, que representam um sério problema ambiental para as indústrias. Em resumo, a operação da fermentação no estado sólido pode ser realizada sem agitação mecânica, com agitação ocasional ou contínua, ou em colunas recheadas com circulação de líquido.

8.7. Cinética de bioprocessos

O estudo cinético de um bioprocesso consiste na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo em função do tempo de fermentação. Entende-se como componentes do sistema de cultivo, o micro-organismo (ou a biomassa), sendo sua concentração representada por X, os produtos do metabolismo (ou metabólitos - produtos de interesse econômico), geralmente representados por P, e os nutrientes ou substratos que compõe o meio de cultura (substrato), representados por S.

Ainda sobre o aspecto populacional é importante se conhecer a cinética de crescimento, os fatores que afetam o tempo de geração e os fatores ambientais que afetam o crescimento.

Os objetivos de se estudar cinética de um processo fermentativo envolvem:



Medir taxas de transformações (curvas de ajuste de S, X e P)



Estudar influência de fatores nestas taxas (pH, T, etc)



Correlacionar por meio de equações empíricas as taxas de transformação e os fatores que nela influenciam



Aplicar o modelo na otimização e controle do processo (visando aumentar rendimentos e produtividades)

Grande parte dos conhecimentos atuais sobre o crescimento microbiano resultaram de estudos com culturas descontínuas (processos conduzidos em batelada), em que as condições nutricionais e ambientais são estabelecidas no início (composição do meio de cultura, pH, temperatura, atividade de água, força iônica, potencial redox) e não são modificadas durante o processo. Neste caso, durante o curso do crescimento em estudo as condições de processo não são manipuladas (adição de base para corrigir pH, adição de nutrientes). Contudo, em uma cultura descontínua as alterações das condições do meio devidas à atividade microbiana são inevitáveis. À medida que progride a multiplicação celular ocorre um acúmulo de produtos do metabolismo e diminuição da concentração de nutrientes que limitam ou anulam (exaustão de nutrientes) o crescimento.

Em uma cultura pura (de uma só população) descontínua, em que se assegurem condições de assepsia, que previnam a contaminação, e que seja iniciada com a adição de células viáveis (inóculo) a um recipiente esterilizado e com um determinado volume de meio de cultura que propicie a fonte de energia adequada ao sistema enzimático do micro-organismo, os nutrientes essenciais (fonte de carbono, de nitrogênio, de fósforo), a ausência de compostos inibidores da atividade enzimática do micro-organismo (antibióticos) e as condições ambientais adequadas (pH, temperatura), é observado o comportamento da concentração celular, concentração de substrato e produto como mostra a Figura 8.4. Para a

concentração de produto, o perfil pode variar bastante em função da classificação cinética.

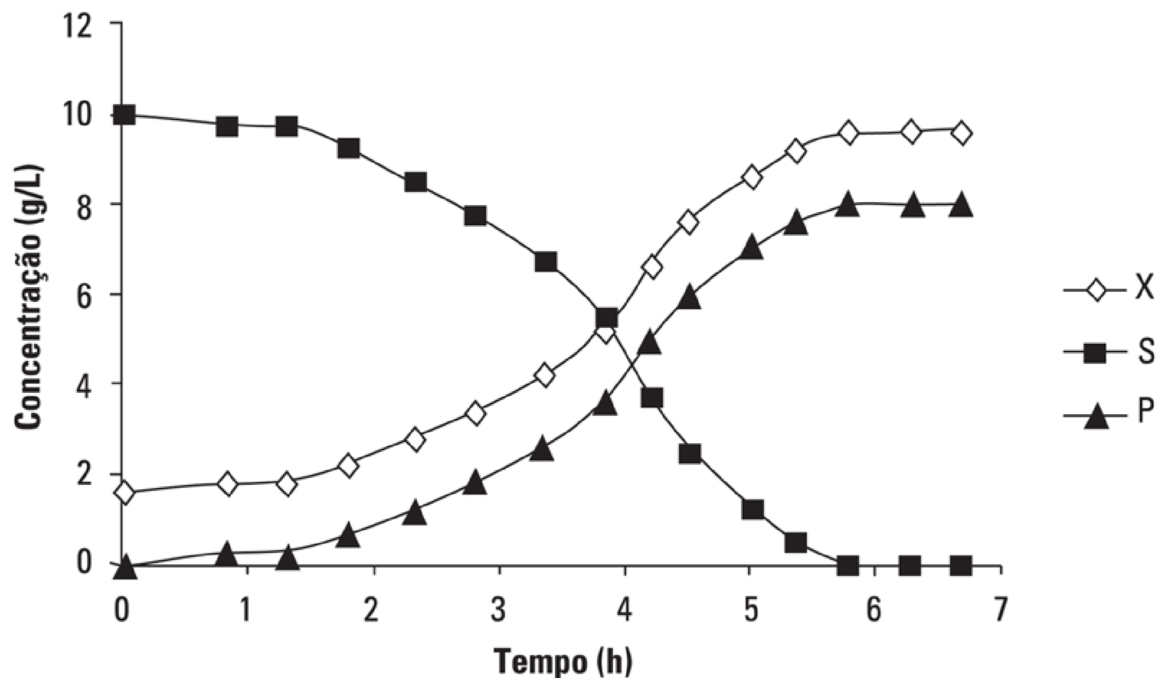


FIGURA 8.4 **Cinética de um bioprocesso realizado em batelada simples. X. concentração celular; S. concentração de substrato; P. concentração de produto.**

8.7.1. Parâmetros de avaliação

As taxas instantâneas de crescimento celular, consumo de substrato e formação de produto são traduzidas pelas seguintes expressões:

$$\frac{dX}{dt} = taxa\ de\ crescimento\ celular\left(\frac{g}{L.h}\right)$$

$$-\frac{dS}{dt} = taxa\ de\ consumo\ de\ substrato \left(\frac{g}{L.h} \right)$$

$$\frac{dP}{dt} = taxa\ de\ formação\ de\ produto \left(\frac{g}{L.h} \right)$$

Essas taxas são obtidas pelos valores das inclinações das tangentes às respectivas curvas em um determinado instante.

Levando em consideração que os valores das taxas instantâneas são muito influenciados pela concentração de células no instante escolhido e que assim torna-se difícil a comparação de diferentes processos, é possível calcular as taxas específicas.

As taxas específicas são calculadas em relação à biomassa (X), segundo as seguintes expressões:

$$\mu = taxa\ específica\ de\ crescimento\ celular \rightarrow \mu = \frac{1}{X}\frac{dX}{dt} = \frac{dlnX}{dt}$$

$$q_S = taxa\ específica\ de\ consumo\ de\ substrato \rightarrow q_S = -\frac{1}{X}\frac{dS}{dt}$$

$$q_P = taxa\ específica\ de\ formação\ de\ produto \rightarrow q_P = \frac{1}{X}\frac{dP}{dt}$$

Em relação à cinética de crescimento celular, ao obtermos o gráfico de ln (X) *versus* tempo, a tangente a cada ponto da curva obtida fornece o valor de μ e obtém-se uma curva de crescimento microbiano com um perfil exponencial, como mostra a Figura 8.5. Observando esse perfil é possível identificar as fases do crescimento celular.

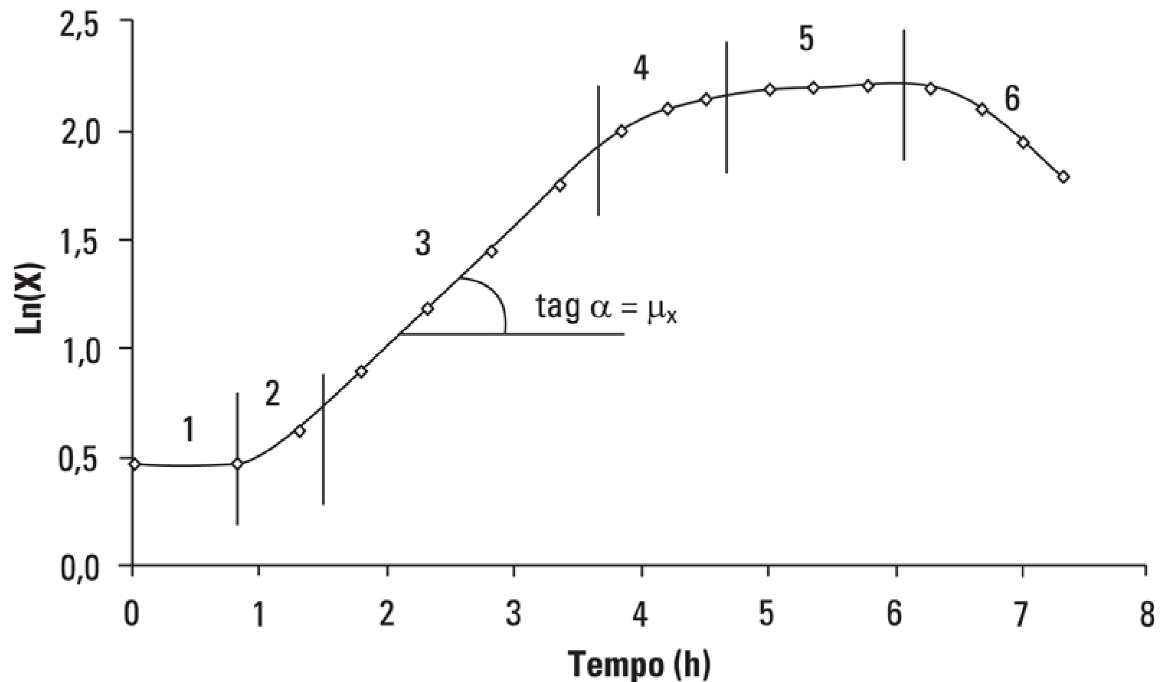


FIGURA 8.5 **Perfil de crescimento celular exponencial. 1. Fase lag ou de adaptação; 2. Fase de aceleração; 3. Fase exponencial ou logarítmica; 4. Fase de desaceleração; 5. Fase estacionária; 6. Fase de morte.**

1. **Fase lag ou fase de adaptação ($\mu = 0$)**

Período variável, onde ainda não há um aumento significativo da população. Ao contrário, é um período onde o número de organismos permanece praticamente inalterado (embora haja consumo irrelevante de substrato). Pode haver aumento de massa celular decorrente do aumento do tamanho de cada célula, pois é o período de síntese de proteínas relacionadas com o metabolismo dos componentes presentes no meio.

A fase lag pode ser observada quando o inóculo inicial é proveniente de culturas mais antigas ou porque as células de fase estacionária encontram-se desprovidas de várias coenzimas essenciais e/ou outros constituintes celulares necessários à absorção dos nutrientes presentes no meio. Essa fase também ocorre quando as células sofrem traumas físicos (choque térmico, radiações) ou químicos (produtos tóxicos), ou quando são transferidas de um meio rico para outro de composição mais pobre, devido à necessidade de síntese de várias enzimas. Durante este período observa-se um aumento na quantidade de proteínas, no peso seco das células e no tamanho celular.

A duração da fase lag varia principalmente com a concentração de inóculo (X_0), a idade do micro-organismo (tempo de pré-cultivo) e seu

estado fisiológico incluindo a adequação às novas condições do meio.

2. **Fase de aceleração ($0 < \mu < \mu_X$)**

Fase de transição em que se observa o início da reprodução microbiana propriamente dita. Ocorre um aumento gradual da taxa de crescimento celular, bem como da taxa específica de crescimento (μ). Ao final desta fase a população começa a se dividir em um intervalo médio de tempo.

3. **Fase logarítmica ou exponencial ($\mu = \mu_X$ = constante)**

Nesta etapa, as células estão plenamente adaptadas, absorvendo os nutrientes, sintetizando seus constituintes, crescendo e se duplicando. Deve ser levado em conta também que, neste momento, a quantidade de produtos finais de metabolismo ainda é pequena. As células do inóculo iniciam o seu crescimento pleno até que as condições do meio comecem a deteriorar (acumulação de produtos do metabolismo, alterações no pH) e passem a ser inibitórias do crescimento.

Considerando a equação da taxa específica de crescimento celular, é possível integrá-la, já que nessa fase μ é constante e igual a μ_X. Considera-se também que no tempo inicial (t = 0), a concentração celular é X_0.

$$\mu = \frac{1}{X}\frac{dX}{dt}$$

$$\int_{X_0}^{X} \frac{dX}{X} = \mu_X \int_0^t dt$$

$$\ln\left(\frac{X}{X_0}\right) = \mu_X t$$

Obtém-se assim uma equação para a concentração de células em relação ao tempo:

$$X = X_0 \exp(\mu_X t)$$

Considerando que o tempo de geração (t_g) é o tempo necessário para duplicação da massa celular, teremos que, em t = tg, X= 2 X_0 e assim:

$$\ln\left(\frac{2X_0}{X_0}\right) = \mu_X t_g$$

$$t_g = \frac{\ln(2)}{\mu_X}$$

Micro-organismos procariotos crescem mais rapidamente que eucariotos, apresentando menor tempo de geração. O tempo de geração de leveduras é em média entre 1,5 e 2 horas, enquanto que, para bactérias, pode ser em média 20 minutos.

4. **Fase de desaceleração ($\mu_X > \mu > 0$)**

Após a fase exponencial, as condições do meio se alteram gradualmente, ao ponto de tornar o crescimento cada vez mais lento até que este acabe por parar. Nesta fase ocorre o esgotamento de um ou mais componentes do meio de cultura, necessários ao crescimento e também devido ao acúmulo de metabólitos inibidores (produtos). Ambas as taxas de crescimento diminuem, e o tempo de geração tende a aumentar, pois nem todos os micro-organismos se reproduzem em intervalos de tempo regulares.

5. **Fase estacionária ($\mu = 0$)**

Nesta fase, a concentração celular X atinge um valor máximo e constante, onde ocorre balanço entre taxa de crescimento e taxa de morte celular. O número total de células viáveis mantém-se constante, enquanto a taxa de crescimento se iguala à taxa de morte celular (não há um crescimento líquido da população, ou seja, o número de células que se divide é equivalente ao número de células que morrem). Nesta fase também ocorrem modificações na estrutura bioquímica da célula. As

células permanecem vivas em função dos nutrientes que acumulam (reservas).

É na fase estacionária que são sintetizados vários metabólitos secundários, que incluem antibióticos e algumas enzimas. Nesta etapa ocorre também a esporulação das bactérias. Foram detectados alguns genes que são necessários à sobrevivência das células na fase estacionária, como fatores alternativos da RNA polimerase e proteínas protetoras contra dano oxidativo.

Células de levedura se mantidas em geladeira permanecem viáveis nesta fase por muito tempo ao contrário de bactérias.

6. **Fase de morte ou declínio ($\mu < 0$)**

Por último, quando o crescimento cessa completamente e o número de células viáveis decai rapidamente, o "ciclo" do crescimento termina com a fase de decaimento ou de morte celular. Nesta fase, a maioria das células está em processo de morte, embora outras ainda estejam se dividindo, mas a concentração celular diminui a uma velocidade que excede a velocidade de produção de células novas. A contagem total permanece relativamente constante, enquanto a de viáveis cai lentamente. Em alguns casos ocorre a lise celular (autólise) ou rompimento dos micro-organismos provocado pela ação de enzimas intracelulares. Culturas descontínuas tendem a sofrer mutações que podem repercutir na população como um todo. As próprias condições ambientais tendem a promover variações de caráter fenotípico (reversível) nas culturas.

Os fatores de rendimento ou conversão são parâmetros também muito utilizados na escolha de processos.

$Y_{P/S}$: fator de rendimento de produto em relação ao substrato ou fator de conversão de substrato em produto. A unidade de $Y_{P/S}$ é dada em g de produto/g de substrato consumido ou mol de produto/mol de substrato consumido.

$$Y_{P/S} = \frac{\text{massa ou mol de produto formado}}{\text{massa ou mol de substrato consumido}}$$

$$Y_{P/S} = \frac{\mathrm{dP / dt}}{-\mathrm{dS / dt}}$$

Sendo $Y_{P/S}$ constante em relação ao tempo:

$$Y_{P/S} = \frac{\Delta \mathrm{P}}{-\Delta \mathrm{S}} = \frac{P - P_0}{(S_0 - S)}$$

$Y_{X/S}$: fator de rendimento de células em relação ao substrato ou fator de conversão de substrato em células. A unidade de $Y_{X/S}$ é dada em g de célula/g de substrato consumido ou mol de célula/mol de substrato consumido.

$$Y_{X/S} = \frac{\text{massa ou mol de célula formada}}{\text{massa ou mol de substrato consumido}}$$

$$Y_{X/S} = \frac{\mathrm{dX / dt}}{-\mathrm{dS / dt}}$$

Sendo $Y_{X/S}$ constante em relação ao tempo:

$$Y_{X/S} = \frac{\Delta \mathrm{X}}{-\Delta \mathrm{S}} = \frac{X - X_0}{(S_0 - S)}$$

$Y_{P/X}$: fator de rendimento de produto em relação à biomassa formada. A unidade de $Y_{P/X}$ é dada em g de produto/g de célula ou mol de produto/mol de célula.

$$Y_{P/X} = \frac{\text{massa ou mol de produto formado}}{\text{massa ou mol de célula viável}}$$

$$Y_{P/X} = \frac{\text{dP / dt}}{-\text{dX / dt}}$$

Sendo $Y_{P/X}$ constante em relação ao tempo:

$$Y_{P/X} = \frac{\Delta \text{P}}{-\Delta \text{X}} = \frac{P - P_0}{(X_0 - X)}$$

Outros fatores de rendimento, também importantes, são aqueles relacionados com a quantidade de substrato inicial e a matéria-prima empregada.

$Y_{P/So}$: Fator de Rendimento de Produto em Relação ao Substrato Inicial.

$$Y_{P/S_0} = \frac{\text{massa ou mol de produto formado}}{\text{massa ou mol de substrato inicial}}$$

$$Y_{P/S_0} = \frac{\Delta \text{P}}{\text{S}_0} = \frac{P - P_0}{S_0}$$

$Y_{X/So}$: Fator de Rendimento de Células em Relação ao Substrato Inicial.

$$Y_{X/S_0} = \frac{\text{massa ou mol de células formado}}{\text{massa ou mol de substrato inicial}}$$

$$Y_{X/S_0} = \frac{\Delta X}{S_0} = \frac{X - X_0}{S_0}$$

$Y_{P/MP}$: Fator de Rendimento de Produto em Relação à matéria-prima empregada.

$$Y_{P/MP} = \frac{\text{massa de produto formado}}{\text{massa de matéria-prima empregada no preparo do meio}}$$

$Y_{X/MP}$: Fator de Rendimento de Células em Relação à matéria-prima empregada.

$$Y_{X/MP} = \frac{\text{massa de células formadas}}{\text{massa de matéria-prima empregada no preparo do meio}}$$

A eficiência do processo é um parâmetro que visa conhecer o quão próximo o rendimento de um processo está do seu valor teórico, ou máximo possível de se obter.

E_f: Eficiência do bioprocesso. A eficiência do bioprocesso está relacionada com a quantidade de produto formado durante o tempo de fermentação (dentro do biorreator).

$$E_f = \frac{\text{massa de produto formado}}{\text{massa de produto obtenível por estequiometria}} * 100$$

$$E_f = \frac{(Y_{P/S})_{processo}}{(Y_{P/S})_{teórico}} * 100$$

No entanto, quando a planta industrial recebe a matéria-prima, podem ocorrer perdas durante o seu tratamento, durante o preparo de meio e esterilização. Além disso, quando o produto sai do biorreator este será separado e purificado. Durante essas etapas ocorrem perdas e, portanto, o cálculo da eficiência global da planta leva tudo isso em consideração.

E_g: Eficiência global da planta.

$$E_g = \frac{\text{massa de produto recuperado} * 100}{\text{massa de produto obtenível a partir do substrato presente na matéria-prima}}$$

A produtividade de um processo é essencial para o projeto de uma planta industrial. É necessário obter esse parâmetro de forma a escolher entre diferentes processos ou mesmo para se calcular o volume do biorreator industrial necessário.

Q_P: Produtividade volumétrica do bioprocesso em relação ao produto

$$Q_P = \frac{\text{massa de produto formado}}{t_f * V_{meio}} = \frac{P}{t_f}$$

Q_X: Produtividade volumétrica do bioprocesso em relação às células

$$Q_X = \frac{\text{massa de células formadas}}{t_f * V_{meio}} = \frac{X}{t_f}$$

$(Pr)_P$: Produtividade mássica do bioprocesso em relação ao produto

$$(Pr)_P = \frac{\text{massa de produto formado}}{t_f} = \frac{P * V_{meio}}{t_f}$$

$(Pr)_X$: Produtividade mássica do bioprocesso em relação às células

$$(Pr)_X = \frac{\text{massa de células formadas}}{t_f} = \frac{X * V_{meio}}{t_f}$$

$(Pr)_g$: Produtividade Mássica Global da Planta

$$(Pr)_g = \frac{\text{massa de produto recuperado}}{\textit{tempo de operação da planta}}$$

8.7.2. Modelos cinéticos

O objetivo geral na formulação de um meio de fermentação é promover suporte para um bom crescimento celular e/ou altas taxas de síntese dos produtos. Isto não necessariamente indica que todos os nutrientes têm que ser fornecidos em excesso. Em alguns casos, a concentração excessiva de um nutriente pode inibir o crescimento celular. Adicionalmente, se as células crescem de forma intensiva, o acúmulo de metabólitos finais pode levar à interrupção do processo bioquímico das células.

Consequentemente, é comum a prática de limitar o crescimento total através da limitação da quantidade de um nutriente do meio. Se a concentração de um nutriente essencial varia enquanto as concentrações dos demais componentes são mantidas constantes, chamamos esse nutriente de **substrato limitante** e a taxa específica de crescimento celular assume uma função hiperbólica.

Portanto, em 1942, o pesquisador Jacques Monod trabalhou com um cultivo contínuo, com vazão volumétrica de meio estéril ($X_0 = 0$) na entrada do reator (F) igual à vazão da corrente de saída do reator, em estado estacionário, como mostra o esquema da Figura 8.6.

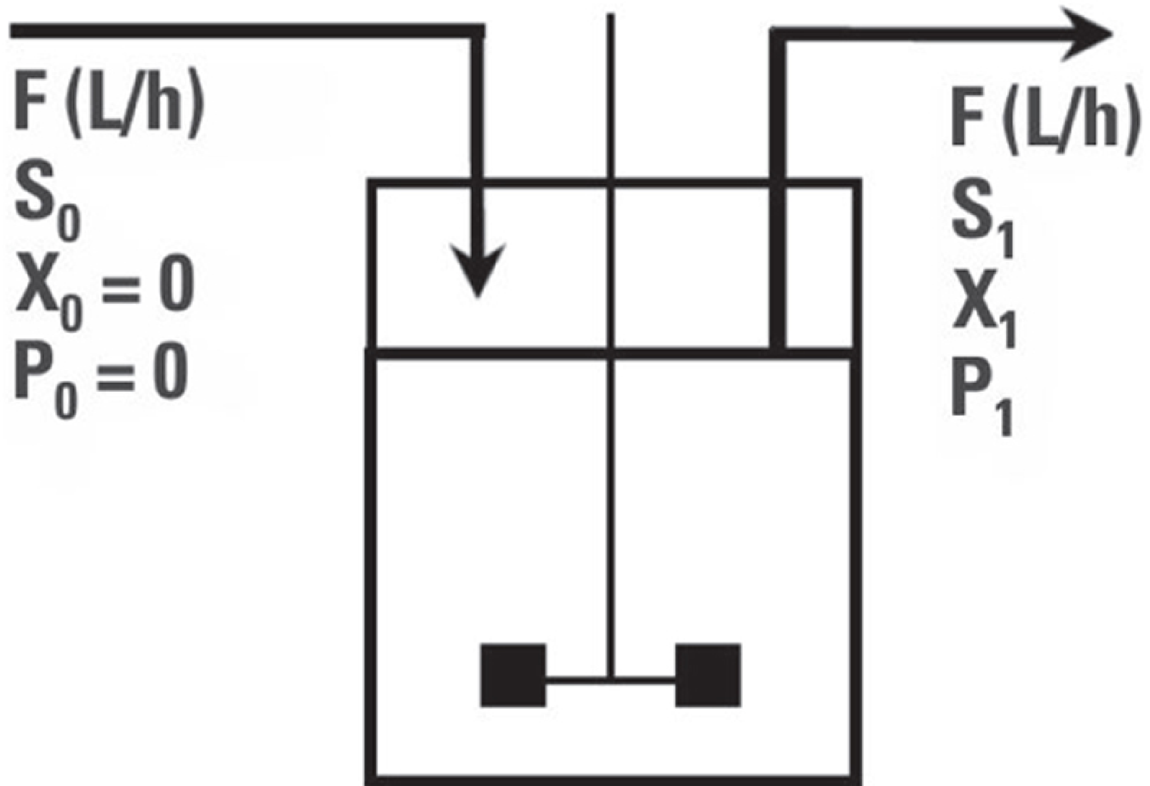


FIGURA 8.6 **Processo Contínuo com um único biorreator. F: vazão volumétrica de alimentação e de meio transformado; S: concentração de substrato; X: concentração de células; P: concentração de produto (o índice "o" refere-se à condição inicial e o índice "1" às concentrações na corrente que sai do biorreator).** *Fonte*: Pereira Jr. *et al.* (2008).

Para esse processo, o balanço de massa para células, se apresenta da seguinte forma:

$$FX_0 - FX + \left(\frac{dX}{dt}\right)_{geração} .V = \left(\frac{dX}{dt}\right)_{acúmulo} .V$$

$$Como\ \ X_0 = 0;\ FX_0 = 0; e\ no\ estado\ estacionário \left(\frac{dX}{dt}\right)_{acúmulo} = 0$$

Portanto:

$$FX = \left(\frac{dX}{dt}\right)_{geração} .V$$

$$\frac{F}{V} = \frac{1}{X}\left(\frac{dX}{dt}\right)_{geração}$$

Definindo-se:

$$taxa\ de\ diluição\ D = \frac{F}{V}$$

Como:

$$\mu = \frac{1}{X}\left(\frac{dX}{dt}\right)_{geração}$$

Para o processo contínuo:

$$\mu = D = \frac{F}{V}$$

Dessa forma, quando Monod trabalhou com um processo contínuo em um biorreator com volume constante, foi possível variar o valor da taxa

específica de crescimento, através da variação da vazão volumétrica F. Com isso, obteve-se como variável resposta a concentração de substrato. Assim foi possível obter o gráfico apresentado na Figura 8.7, que mostra uma relação hiperbólica entre a taxa específica de crescimento celular e a concentração de substrato, obtendo-se a seguinte equação, chamada de Equação de Monod:

$$\mu = \mu_{máx} \frac{S}{K_S + S}$$

onde, μ_{max} é taxa específica máxima de crescimento celular para um determinado micro-organismo em relação a um substrato específico e K_S é o valor da concentração de substrato para a qual a taxa específica de crescimento é metade do máximo nas condições do ensaio, como mostra a Figura 8.7.

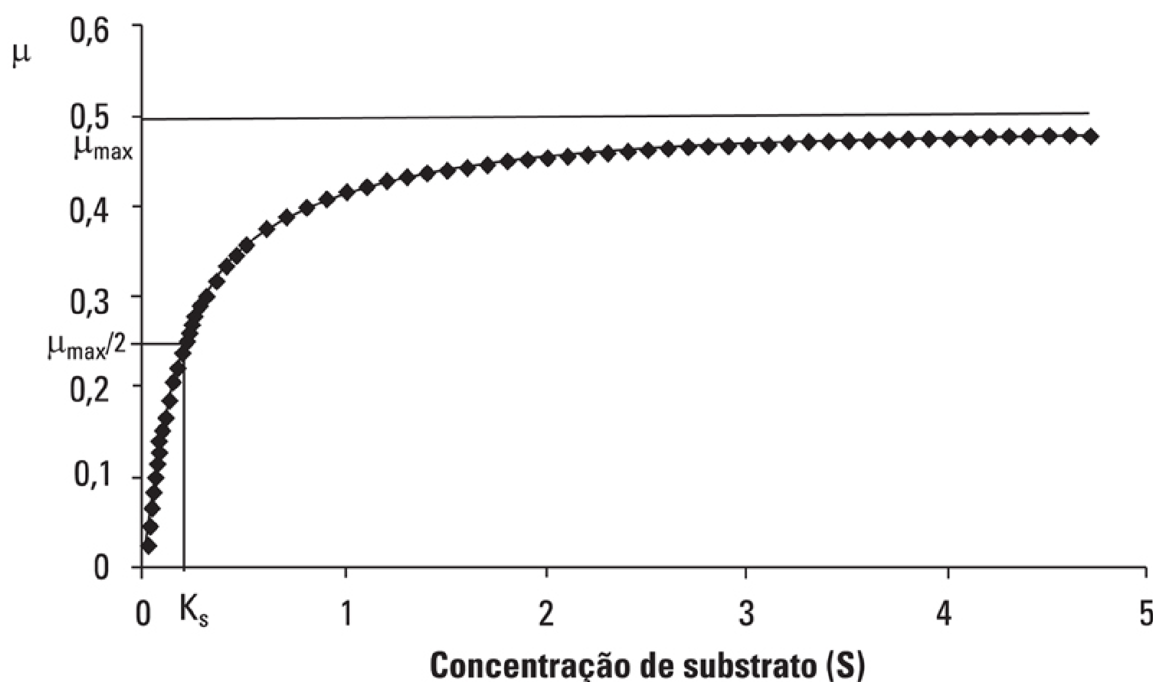


FIGURA 8.7 **Relação hiperbólica entre a taxa específica de crescimento (μ) e a concentração de substrato limitante, segundo Monod.**

Essa equação é bem similar à equação de Michaelis e Menten para a cinética enzimática, em que o significado do parâmetro K_m é associado à constante de equilíbrio de dissociação do complexo enzima-substrato. No entanto, o processo de crescimento celular não envolve apenas uma reação enzimática, mas sim várias. Portanto, o valor de K_S não representa a constante de saturação para o consumo de substrato, mas sim uma constante de saturação global para todo o processo de crescimento. No entanto, como a entrada do substrato na célula está geralmente envolvida no controle do metabolismo do substrato, o valor de K_S é, em muitos casos, próximo dos valores de K_m do sistema de entrada de substrato nas células.

O modelo de Monod é o modelo mais simples e mais frequentemente utilizado. No entanto, é claro que esse modelo não consegue se ajustar aos dados de todos os tipos de bioprocessos. Muitos autores já tentaram melhorar o modelo de Monod, como mostra a Tabela 8.1. Esses modelos podem servir para ajustar dados cinéticos e assim ser usados como modelos de controle em fermentações industriais específicas, mas sua aplicação para pesquisa é bem limitada já que eles não revelam quase nada sobre os possíveis mecanismos por trás dos fenômenos observados.

Tabela 8.1

Compilação de diferentes modelos cinéticos

Nome	Expressão cinética
Tessier	$\mu = \mu_{máx} \dfrac{S^n}{S^n + K_S}$
Moser	$\mu = \mu_{máx} \dfrac{S}{S + K_S x}$
Contois	$\mu = \mu_{máx} \left(1 - e^{-\frac{S}{K_S}}\right)$
Blackman	$\mu = \begin{cases} \mu_{máx} \dfrac{S}{2K_S}; \; S \leq 2K_S \\ \mu_{máx}; \; S > 2K_S \end{cases}$
Logistic law	$\mu = \mu_{máx} \left(1 - \dfrac{X}{K_X}\right)$

Fonte: Nielsen *et al.* (2003).

Todos esses modelos assumem que há apenas um substrato limitante, mas é comum encontrar processos em que a concentração de mais de um substrato influencie a taxa específica de crescimento. Tsao e Hansen (1975 *apud* Nielsen *et al.*, 2003) propuseram um modelo geral com multiparâmetros para o crescimento com múltiplos substratos:

$$\mu = \left(1 + \sum_i \frac{s_{e,i}}{s_{e,i} + K_{e,i}}\right) \prod_j \frac{\mu_{max,j} s_j}{s_j + K_{s,j}}$$

Em que $S_{e,i}$ é a concentração de substratos que aumentam o crescimento e S_j é a concentração de substratos que são essenciais para o crescimento. Esse modelo é aplicado apenas no caso dos substratos serem consumidos ao mesmo tempo. Quando os substratos são consumidos em ordem preferencial, esse modelo não pode ser utilizado.

Em muitos casos, o crescimento é inibido por altas concentrações do substrato limitante ou pela presença de um produto metabólico. Para levar em consideração essas possibilidades, a cinética de Monod é geralmente estendida com termos adicionais. Portanto, para a inibição por altas concentrações de substrato, tem-se:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{\frac{S^2}{K_i} + S + K_S}$$

E para a inibição pelo produto, tem-se:

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_S} \frac{1}{1 + P / K_i}$$

Ou

$$\mu = \mu_{max} \frac{S}{S + K_S} \left(1 - \frac{P}{P_{max}}\right)$$

8.8. Controle de bioprocessos

Durante as últimas décadas, muitos esforços vêm sendo empregados no sentido de melhorar a qualidade dos produtos e serviços, bem como a sua forma de gerenciamento. Além disso, as pressões existentes em relação à qualidade e à preservação do meio ambiente conduziram a padrões cada vez mais rigorosos.

Deste modo, é inerente a necessidade de se operar as unidades produtivas em limites restritos e, portanto, a automação e a engenharia de controle são ferramentas que apresentam ampla aplicabilidade nestes casos. Tal realidade se apresenta e a falta de interação entre diferentes grupos leva à perda de oportunidades na aplicação de novas (e antigas) técnicas de controle na prática.

Contudo, existe uma tendência no sentido de explorar as possíveis estratégias de controle em bioprocessos, visando melhorar a performance e reduzir os custos de operação e o consumo de energia.

Como os bioprocessos são normalmente conduzidos em regime transiente (batelada ou batelada alimentada), a otimização de um bioprocesso envolve o uso de funções de desempenho temporais, como um perfil adequado de temperatura, pH, potencial óxido-redutivo, CO_2 e/ou oxigênio dissolvido em função do tempo de fermentação, uma vez que estas podem levar a alterações no metabolismo celular. Adicionalmente, outras variáveis como taxa de agitação, viscosidade do meio, área específica interfacial, entre outras, ocasionam influências indiretas nos fenômenos de transporte do meio para a célula e vice-versa.

Um dos grandes gargalos existentes no controle de processos biotecnológicos decorre da dificuldade de medições de variáveis de processo a serem controladas. No caso de variáveis físicas, como temperatura, vazão, velocidade de agitação e taxa de aeração, ou físico-químicas, como pH, potencial redox, pressão parcial de oxigênio e a composição dos gases de saída, estas são usualmente empregadas como medições diretas, disponibilizadas em tempo real (*on-line*) através da utilização de sistemas de controle supervisórios e outros equipamentos comerciais.

Por outro lado, esforços têm sido despendidos no sentido de desenvolver e/ou aprimorar a análise dos bioprocessos, através de medições químicas ou bioquímicas da composição do meio fermentativo. Deste modo, importantes informações sobre o processo podem ser adquiridas e empregadas no controle das concentrações de suas variáveis-

chave. Ressalta-se, ainda, que a modelagem matemática dos bioprocessos possibilita a otimização e inferência de estados dos mesmos.

Na área de otimização de processos, sabe-se que as contribuições obtidas no projeto de processos contínuos não são usualmente aplicadas aos processos em batelada, principalmente devido ao modo transiente da operação do processo. Por outro lado, os estudos de processos em batelada direcionam-se à programação do processo, o que significa dizer à otimização de um conjunto de equipamentos em batelada, onde cada equipamento é contabilizado como um sistema. Todavia, na indústria atual, um projeto eficiente, planejamento e operação adequados das plantas em batelada tornaram-se fatores de grande impacto na viabilidade econômica do processo. Por outro lado, considerar apenas as condições ótimas de operação de um reator batelada pode não garantir a adequabilidade da implementação de tais trajetórias ótimas.

Além dos controles físico-químicos adotados nos biorreatores, o controle da população microbiana que atua nesse sistema parece fundamental. Esse controle envolve o conhecimento dos aspectos morfológicos do micro-organismo. Por exemplo, uma simples observação microscópica ao longo do processo pode nos dar uma garantia do bom andamento do mesmo, quando a morfologia micro ou macroscópica se mostra característica e típica. No entanto, quando a morfologia é alterada, temos um forte indício de que algo errado aconteceu. Uma diversidade morfológica pode também indicar uma contaminação, o que pode se transformar num prejuízo à obtenção do produto.

8.9. Processos de separação e purificação de bioprodutos

Outra parte integrante de um bioprocesso e que também define o seu êxito é a seção de recuperação de produto (*downstream processing*).

Nesta fase, informações de aspectos citológicos e fisiológicos do micro-organismo serão de grande valia. A fisiologia microbiana indicará não apenas a geração como também a localização do produto. Se o mesmo for secretado, as etapas de recuperação seguem um roteiro diferente da recuperação do produto intracelular. No segundo caso será necessário romper estruturas celulares cuja composição será importante na escolha das técnicas adequadas que tenham êxito na liberação do produto. O projeto dos equipamentos que irão compor esta seção será função da localização do produto (intracelular ou extracelular), do seu tamanho molecular, concentração, solubilidade, polaridade, volatilidade e outras propriedades físico-químicas do meio de fermentação, como viscosidade, densidade, impurezas e partículas indesejáveis. A opção pelas operações de separação será influenciada pelo tamanho do próprio bioprocesso e do valor do produto. Os arranjos deverão ser em série a fim de atingir o grau de pureza (por exemplo, extratos enzimáticos brutos ou enzima purificada) e a forma final exigidos para um produto (produto cristalizado, liofilizado, líquido concentrado, prensado). A sequência de operações, através das quais o meio, contendo a substância a ser separada, deve passar para a obtenção de um produto de alta pureza, constitui-se basicamente de quatro etapas.

1. **Remoção de material insolúvel** (particulado). Operações comuns: filtração, centrifugação, decantação ou sedimentação.
2. **Isolamento primário**. Durante esta etapa a concentração de produto aumenta consideravelmente e substâncias com diferentes polaridades são separadas do produto. Operações típicas: extração por solvente, precipitação e ultrafiltração.
3. **Purificação**. Destina-se à remoção de impurezas como também concentração de produto. Exemplos são a precipitação fracionada e muitos tipos de cromatografia e adsorção.
4. **Isolamento final do produto**. Esta última etapa deve fornecer o produto desejado numa forma adequada para formulação final ou comercialização direta. As operações aqui incluem: centrifugação e

subsequente secagem de um produto cristalizado (liofilizado ou seco por *spray drying*).

8.10. Considerações gerais

Para que os bioprocessos possam despertar o interesse tecnológico e comercial, seja na criação de um processo novo, ou na otimização de um já existente, é essencial entender os fatores tecnológicos que afetam significativamente a sua competitividade. Tais processos têm seu desempenho avaliado através dos seguintes parâmetros, que ditarão sua viabilidade.

- Coeficientes de conversão em relação ao substrato metabolizado e à matéria-prima.
- Taxas de crescimento do agente microbiano, de consumo de substrato e de formação de produto.
- Afinidade da cultura microbiana com o(s) substrato(s).
- Estabilidade da cultura microbiana.
- Produtividade.
- Concentração de produto do meio fermentado.

Algumas transformações microbianas, analogamente às reações químicas, atingem rendimentos próximos ao máximo estequiométrico (produtos do metabolismo primário), embora apresentando taxas globais de produção baixas. Outras, como as do metabolismo secundário, resultam em baixos valores de rendimento e produtividade, havendo um enorme campo para avanços em ambos os casos. Os progressos serão alcançados através de uma maior compreensão sobre a fisiologia microbiana e da interação do micro-organismo com o ambiente químico e físico no biorreator. É esta combinação, este binômio micro-organismo (ou enzima)/meio ambiente, que define o êxito de um bioprocesso.

De uma maneira geral, o programa de desenvolvimento de um bioprocesso envolve as seguintes etapas: seleção e melhoramento de linhagens produtoras, otimização de meio de cultura em frascos agitados, experimentos em biorreatores de laboratório, que permitem uma melhor compreensão sobre o processo, avaliação em escala piloto e, posteriormente, estudos de ampliação de escala.

Os Bioprocessos devem ser frequentemente reavaliados, e incorporar inovações tecnológicas, a fim de se aumentar sua performance e a lucratividade.

A absorção de inovações tecnológicas, somente conseguidas através de P&D, produz grande impacto no desenvolvimento de bioprocessos. Assim, por exemplo, podemos lançar mão de técnicas da biologia molecular para se dotar um micro-organismo de uma determinada

propriedade de interesse, ou mesmo potencializá-la no agente microbiano, que a exibe com baixa expressão. Muito conhecimento novo é gerado, também, na área de engenharia metabólica, através da manipulação do metabolismo, decorrente de fenômenos de indução, repressão e até inativação de determinadas enzimas, levando à formação preferencial de um dado produto, por exemplo. As técnicas de imobilização celular, que possibilitam a supressão de equipamentos onerosos para separação de células; os biorreatores não convencionais, menos intensivos no aporte de energia e mais eficientes e produtivos; o desenvolvimento de biossensores, integrados ao controle de bioprocessos; o aproveitamento de resíduos como matéria-prima para bioconversores; bem como o reciclo de efluentes no próprio processo, minimizando a geração dos mesmos, são outros exemplos de inovações tecnológicas.

Revisão dos conceitos apresentados

O conceito de bioprocessos está relacionado com as operações que efetuam o tratamento da matéria-prima, o preparo dos meios de propagação e produção, a esterilização, se assim o processo demandar, e a transformação do substrato em produto(s) por rota bioquímica, seguida de processos de separação e purificação de produto(s). Uma grande variedade de matérias-primas é utilizada como fonte de substratos e outros nutrientes. As matérias-primas sacaríneas contêm substratos solúveis que podem ser facilmente extraídos e convertidos prontamente a produto; as matérias-primas amiláceas contêm polissacarídeos insolúveis, que precisam de tratamento moderado para solubilização e hidrólise, antes da conversão a produto(s); enquanto que as matérias-primas lignocelulósicas contêm polissacarídeos insolúveis altamente resistentes, que necessitam de pré-tratamento físico, seguido de hidrólise química ou enzimática para produzir substratos na forma monomérica, que serão convertidos a produto(s). Não se pode esquecer que os meios de propagação e produção preparados a partir dessas matérias primas devem conter os nutrientes (substrato, fonte de nitrogênio, cofatores, precursores, elementos traços) em concentrações otimizadas. O biocatalisador (micro-organismo, célula animal, vegetal ou enzima), deve ser selecionado em função das seguintes propriedades: elevada atividade, estabilidade, sendo tolerante e resistente a substâncias tóxicas. O metabolismo dos biocatalisadores compreende o catabolismo, processo no qual as substâncias são degradadas a moléculas menores, liberando energia (reações exergônicas) e o

anabolismo, que é o processo que envolve reações endergônicas, para obtenção dos blocos de construção da célula.

Os bioprocessos ocorrem em um biorreator, onde vários fenômenos químicos, físicos e, naturalmente, biológicos ocorrem. Os biorreatores podem ser classificados quanto ao tipo de mistura em biorreatores agitados mecanicamente, que são os mais estudados e utilizados industrialmente; biorreatores agitados hidraulicamente, os quais apresentam agitação do líquido por circulação do próprio meio de cultivo; biorreatores agitados pneumaticamente, onde através da movimentação das bolhas gasosas há transferência de energia cinética ao líquido (por exemplo, *airlift* ou *bubble column*); ou reatores de fluxo pistonado que são os reatores de leito fixo com células ou enzimas imobilizadas.

A forma mais utilizada de condução de bioprocessos é a batelada simples. O principal problema desta forma de operar bioprocessos é decorrente de fenômenos de inibição pelo substrato, produto, ou outros metabólitos. Para se contornar esses problemas de inibição/repressão, outras formas de condução podem ser utilizadas, como a batelada alimentada e suas variantes. A condução contínua é outra modalidade de se operar biorreatores, que apresenta como vantagem a possibilidade de se operar o sistema por extensos períodos de tempo, resultando em aumento de produtividade. Bioprocessos podem ainda ser operados em superfície, no qual o agente se desenvolve na superfície do meio de cultivo; em profundidade (submerso), em que a célula produtora se desenvolve no seio do meio de cultivo, geralmente agitado; e por fermentação no estado sólido, no qual o crescimento microbiano e a formação de produto ocorrem na superfície de substratos sólidos e na ausência de água livre.

O estudo cinético de um bioprocesso consiste na análise da evolução dos valores de concentração de um ou mais componentes do sistema de cultivo em função do tempo de fermentação, que tem por objetivo: medir taxas de transformações; estudar influência de fatores nestas taxas (pH, T etc.); correlacionar por meio de equações empíricas as taxas de transformação e os fatores que nela influenciam; e aplicar o modelo na otimização e controle do processo. Os parâmetros calculados são: as taxas instantâneas de crescimento celular; o consumo de substrato e formação de produto; as taxas específicas, em relação à concentração celular; os fatores de rendimento ou conversão; a eficiência; e as produtividades do processo global da planta.

Os processos de recuperação de produtos ao final do bioprocesso envolvem a remoção de material insolúvel (particulado), o isolamento primário, a purificação e o isolamento final do produto.

Questões

1. "O conhecimento e a compreensão do metabolismo microbiano é a chave para o desenvolvimento de bioprocessos". Comente esta afirmativa.
2. Apresente resumidamente as principais diferenças existentes entre as matérias-primas sacaríneas, comparadas às amiláceas e às lignocelulósicas, quando estas são utilizadas como fonte de substrato para um dado bioprocesso (por exemplo, a produção de álcool).
3. O sucesso de um dado processo fermentativo depende muito de uma correta definição de quatro pontos básicos, sendo um deles o meio de cultura. Descreva as principais características que este meio de cultivo deve ter de modo que possa atender: a demanda nutricional do micro-organismo produtor, aos objetivos do processo e à escala de operação.
4. Assim como a determinação das condições ótimas de operação de um dado bioprocesso é imprescindível, o conhecimento da estequiometria teórica deste dado bioprocesso também é de fundamental importância. Explique o porquê justificando sua resposta.
5. Em um bioprocesso, um nutriente essencial do meio, quando em alta concentração, pode provocar problemas de inibição. Que alternativa(s) você escolheria para contornar o problema.
6. "Um mesmo bioprocesso pode ser conduzido de diferentes formas". Apresente sua opinião em relação à veracidade ou não da afirmação, justificando sua resposta.
7. Um bioprocesso apresenta as seguintes características: Concentração inicial de substrato: 150 g/L; Concentração final de substrato: 2 g/L; Concentração final de produto: 118,4 g/L; Concentração inicial de células: 2 g/L; Concentração final de células: 10 g/L; Tempo de fermentação 60 h. Com base nestes dados, calcule:
    a. $Y_{P/S}$, $Y_{P/X}$, $Y_{X/S}$, $Y_{P/So}$
    b. Produtividade volumétrica

   c. Produtividade mássica, considerando que o volume de meio no reator é igual a 10 L.

8. Uma planta produtora de álcool opera com biorreatores de 250 m^3, contendo 225 m^3 de mosto. A matéria-prima é melaço (50% P/P em ART – açúcares redutores totais) e, durante seu beneficiamento, há perdas de 2% em peso de melaço. As concentrações inicial e final de ART no meio são 150 g/L e 2 g/L, respectivamente, sendo o fator de conversão de ART em etanol igual a 0,49 g de etanol/g ART consumido. Durante a destilação, há perdas de 8% em peso de etanol. Com base nestes dados, calcule:
   a. A eficiência do bioprocesso
   b. A quantidade de melaço gasta por biorreator no preparo de meio
   c. A eficiência da planta

Tópicos para discussão

1. Matérias-primas lignocelulósicas: há futuro para sua utilização para obtenção de etanol? Considere os custos dos pré-tratamentos e processamentos necessários e as várias alternativas de processo para contornar esse problema.
2. Discuta sobre as diferenças entre os processos químicos convencionais e os bioprocessos, considerando as vantagens e desvantagens de cada um.
3. Os Bioprocessos de uma forma geral, podem ser considerados como “tecnologias limpas”. Discuta essa afirmativa.

Sugestões para pesquisa

1. Pesquise na literatura os possíveis métodos de separação e purificação para um bioprocesso de produção de ácido cítrico a partir de melaço utilizando fungo filamentoso como catalisador do processo.
2. Descreva a configuração básica para um biorreator (tamanho, material, variáveis monitoradas, etc) para produção de biomassa microbiana utilizando melaço de cana de açúcar.
3. Busque na literatura processos que apresentem vantagens com a utilização da operação em batelada alimentada.

Referências

Aiba S, Humphrey AE, Millis N. *Biochemical Engineering*. 2nd ed. University of Tokyo Press, Academic Press; 1973.

Bailey JE, Ollis DF. *Biochemical Engineering Fundamentals*. New York: McGraw Hill Co; 1977.

Nielsen J, Villadsen J, Lidén G. *Bioreaction Engineering Principles*. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers; 2003.

Borzani Q, Lima UA, Aquarone E. *Biotecnologia Industrial*. São Paulo: Editora Edgar Blucher; 2001.

Borzani Q, Lima UA, Aquarone E. *Processos Fermentativos e Enzimáticos*. São Paulo: Editora Edgar Blucher; 2001.

Pereira Jr N, Bom EPS, Ferrara MA. Tecnologia de Bioprocessos. *Séries em Biotecnologia*. Rio de Janeiro: Editora Amiga Digital; 2008.

Reed G. *Prescott and Dunn's Industrial Microbiology*. 4th ed. New Delly: CBS Publishers & Distributors; 2004.

CAPÍTULO

9

Produção de Enzimas Microbianas

Alane Beatriz Vermelho

Ana Maria Mazotto de Almeida

Maria Cristina Pinheiro Pereira Reis Mansur

Mateus Gomes de Godoy

Rodrigo Pires do Nascimento

Selma Soares de Oliveira

Verônica da Silva Cardoso

Conceitos apresentados neste capítulo

Neste capítulo são apresentadas as principais classes de enzimas microbianas que podem ser aplicadas nos diversos setores da indústria. Dentre as enzimas de maior relevância podemos destacar as peptidases, amilases, transglutaminases, lipases e o complexo das holocelulases. A definição, principais reações catalisadas e aplicações industriais são descritas ao longo deste capítulo. Um tópico sobre as estratégias moleculares de produção das enzimas microbianas descreve as modernas técnicas empregadas hoje para controle da produção das enzimas microbianas.

9.1. Introdução

As enzimas são catalizadores proteicos específicos ao substrato e podem acelerar a velocidade de uma reação bioquímica de 10^2 a 10^3 vezes, além de oferecerem processos mais competitivos quando comparadas aos catalizadores químicos (Braz e Sakuma, 2012). As enzimas podem ser classificadas quanto à forma de uso e quanto ao mecanismo de ação. Com relação ao seu uso elas podem ser do tipo que (i) a enzima catalisa a principal reação química do sistema (por exemplo, Amido sendo convertido a Glucose pela Amilase); (ii) as enzimas são relevantes nas reações que complementam as características do produto; e (iii) a enzima é o próprio produto combinada a outro componente (produto farmacêutico). Em se tratando do mecanismo de ação sobre o substrato, elas podem ser classificadas em 6 grupos, como descrito na Tabela 9.1.

Tabela 9.1

Classificação geral das enzimas quanto ao mecanismo de ação

Código EC*	Classe da enzima	Reação catalisada
1	Oxirredutases	Catalisam reações de oxirredução do substrato
2	Transferases	Catalisam reações de transferência de grupos químicos de substratos para moléculas aceptoras
3	Hidrolases	Catalisam reações de hidrólise de ligações covalentes do substrato com participação de água
4	Liases	Catalisam reações de remoção de grupos dos substratos formando ligações duplas e vice-versa
5	Isomerases	Catalisam reações de isomerização do substrato
6	Ligases	Catalisam reações de ligação covalente de duas moléculas

Fonte: Coelho *et al.* (2008).

* Código EC (*Enzyme Class*) = o número EC é uma classificação numérica para designar o mecanismo de ação de cada enzima, baseado no *Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology* (NC-IUBMB)

Atualmente a biocatálise ocupa um lugar importante na indústria e paralelamente houve um grande avanço nos bioprocessos permitindo a produção de enzimas com um custo menor e uso seguro para a indústria. O desafio consiste em fabricar biocatalisadores que preservem as propriedades funcionais das enzimas robustas o suficiente para suportar as severas condições de produção.

A biocatálise destaca-se no cenário atual da Biotecnologia Branca aliada à estrutura de trabalho da Química Verde envolvendo muitas estratégias desenvolvidas em diversas áreas, como: genética, biologia molecular, bioengenharia, tecnologia das fermentações, bioinformática, nanotecnologia, ciências dos materiais, espectroscopia avançada, cristalografia das proteínas, entre outras que aliadas buscam a melhoria da atividade enzimática baseadas na modificação física da estrutura proteica ou do DNA, na imobilização das enzimas, na redução dos custos da produção, no aumento de rendimento para ampliar o

escopo das aplicações de enzimas já existentes no mercado (Illanes, 2012). A descoberta de novas enzimas microbianas pode levar de meses até anos, portanto, há um enorme interesse em modificar enzimas existentes para sua adequação às necessidades industriais da atualidade. O maior objetivo é redesenhar as proteínas numa direção que os processos industriais possam ser realizados de uma forma mais econômica e ambientalmente correta. Como não existe uma estratégia universal para alterar qualquer enzima, múltiplas abordagens devem ser consideradas para o desenvolvimento de processos seletivos para mimetizar o processo evolucionário natural e introduzir propriedades específicas em biocatalizadores de interesse industrial. Estas técnicas podem contribuir significativamente para o desenvolvimento dos biocatalisadores com novas características desejadas a fim de se adequarem às diversas aplicações biotecnológicas (Joshi e Satyanarayana, 2015).

As enzimas microbianas neste cenário ganham destaque quando comparadas às enzimas de origem animal e vegetal. Os micróbios são fáceis de cultivar em condições controladas em biorreatores, com alta reprodutibilidade do produto final que é a enzima. Também podem ser facilmente manipulados geneticamente podendo ter a produção das enzimas aumentada por meio da produção de recombinantes ou das técnicas que envolvem a biologia sintética. As enzimas animais exigem um controle sanitário rigoroso e processos de isolamento e purificação complexos. Do mesmo modo, as enzimas vegetais exigem um processo de isolamento, e devido a variações do solo, tipo de semente, clima e outros parâmetros a reprodutibilidade do processo se torna comprometida (Vermelho *et al.*, 2013).

As enzimas têm grande importância na indústria, sendo aplicadas em diversos setores que incluem o de bioenergia, ambiental, indústrias farmacêuticas, de alimentos e rações, têxtil e de papel. Na indústria de cosméticos e produtos de higiene pessoal, a utilização de enzimas tem aumentado, o que pode ser parcialmente atribuído a uma tendência crescente em substituir os ingredientes cosméticos tradicionais, usualmente derivados petroquímicos, por substâncias orgânicas e naturais.

O mercado global de enzimas industriais se expandirá significativamente nos próximos cinco anos, com a indústria de cosméticos apontada como um dos principais condutores devido à alta demanda. O segmento cresce 5% a cada ano, com taxa de crescimento anual em 2015 atingindo um valor estimado de US$3,74 bilhões. A Europa permanece como o maior mercado para enzimas atrás dos Estados Unidos, que domina o mercado mundial. Entretanto, o crescimento econômico da Ásia está ajudando a aumentar o crescimento global estimado em 8% neste ano (Pitman, 2011).

Neste capitulo serão abordadas a produção, características e aplicações de alguns tipos de enzimas microbianas da classe das hidrolases (EC 3) como as peptidases (EC 3.4.), amilases (EC 3.2.1.-), celulases (EC 3.2.1.4) e lipases (EC 3.1.1.3). Biocatalisadores da classe das transferases (EC 2-), como as transglutaminases (EC 2.3.2.13), e alguns tipos de amilases (EC 2.4-) também serão descritos. Todas estas

enzimas possuem mútliplas aplicações industriais e são muito estudadas e encontradas em grande diversidade de microrganismos.

9.2. Peptidases

As peptidases, também chamadas de proteases, proteinases ou enzimas proteolíticas, são o principal grupo de enzimas comercializadas atualmente. Adotaremos o termo peptidase, que é o recomendado pelo Comitê de Nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular e pelo sistema MEROPS, um banco de dados criado para dar suporte à classificação destas enzimas (www.merops.acd.uk). Peptidases são enzimas proteolíticas que catalisam a hidrólise de ligações peptídicas. São enzimas essenciais para a manutenção da vida e são codificadas por aproximadamente 2% dos genes em todos os organismos. Estas enzimas são importantes em muitos processos biológicos como a digestão de proteínas alimentares, a reciclagem intracelular de proteínas, a cascata de coagulação sanguínea, a apresentação de antígeno e ativação de outras proteínas, incluindo as enzimas, os hormônios peptídicos e os neurotransmissores (Rawlings, Morton e Barrett, 2007).

A estrutura em volta do sítio ativo das proteases determina como o substrato pode se ligar aos sítios da enzima. As superfícies da peptidase que são capazes de acomodar o substrato são chamadas de subsítios e determinam a especificidade ao substrato da enzima. Cada subsítio específico é capaz de acomodar a cadeia lateral de um único resíduo de aminoácido do substrato (Figura 9.1). Apenas poucos resíduos de aminoácidos participam efetivamente do mecanismo de catálise. Estes sítios são numerados a partir do sítio catalítico como S1, S2, Sn em direção do N-terminal e como S1′, S2′, Sn′ em direção ao C-terminal. Os resíduos que eles acomodam são numerados P1, P2, Pn e P1′, P2′, Pn′, respectivamente, como representado abaixo:

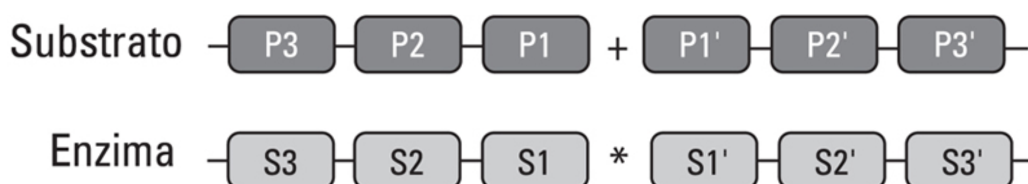


FIGURA 9.1 **Modelo conceitual de especificidade das peptidases.**

9.2.1. Classificação das peptidases

Segundo o Comitê de Nomenclatura Enzimática (EC), as peptidases pertencem à classe 3 (hidrolases) e subclasse 3.4 (peptídeo-hidrolases ou peptidases) (Rawlings, Morton e Barrett, 2007). As peptidases são classificadas segundo o tipo catalítico, de acordo com os grupos químicos presentes no centro ativo responsáveis pela catálise da ligação peptídica. Atualmente, são descritos sete tipos catalíticos: cisteína, treonina, glutâmico, aspártico, asparagina e serina peptidases, em função da presença destes aminoácidos no centro ativo da molécula proteica, e

metalopeptidase quando um ou dois íons metálicos estão envolvidos no mecanismo catalítico (Rao *et al.*, 1998; Vermelho *et al.*, 2008; Bateman, 2011). A maioria das metalopeptidases possui zinco no sítio ativo, podendo também ocorrer cobalto, manganês ou cobre. Algumas peptidases têm seus mecanismos de ação ainda desconhecidos e são classificadas separadamente tanto pelo Comitê de Nomenclatura Enzimática no subgrupo EC 3.4.99 quanto pelo MEROPS na família U (Rawlings, Morton e Barrett, 2007).

As peptidases também são classificadas de acordo com o tipo de reação que catalisam, uma vez que são seletivas quanto à posição da ligação peptídica no substrato. Desta forma as peptidases são classificadas como exopetidases (EC 3.4.11-19), quando clivam aminoácidos terminais, e endopeptidases (EC 3.4.21-99), quando hidrolisam ligações peptídicas no interior da cadeia polipeptídica (Tabela 9.2). As endopeptidases também hidrolisam oligopeptídeos, sendo então chamadas de oligopeptidases ou clivam uma ligação a uma distância fixa de um dos terminais. Elas podem ser serina, cisteína, aspártico, metalo e treonina peptidases. Já as exopeptidases requerem um N- ou C terminal livre, ou ambos, e não clivam mais que três resíduos de aminoácidos terminais. Aquelas que atuam na região N-terminal podem liberar um único aminoácido (aminopeptidase), um dipeptídeo (dipeptidil-peptidases) ou um tripeptídeo (tripeptidilpeptidases). Já as carboxipeptidases clivam um aminoácido ou um dipeptídeo (peptidildipeptidase). Algumas exopeptidases hidrolisam dipeptídeos, e outras removem unidades de aminoácidos substituídos, ciclizados ou ligados por ligação isopeptídica, neste último caso, denominadas ômega peptidases (Bon e Vermelho, 2004; Rawlings, Morton e Barrett, 2007).

Tabela 9.2

Classificação das peptidases de acordo com tipo de reação catalisada

Nomenclatura	Exemplo
Endopeptidase (EC 3.4.21-24)	Pepsina (A01.001)
Aminopeptidase (EC 3.4.11)	Aminopeptidase N (M01.001)
Dipeptidil-peptidase (EC 3.4.14)	Dipeptidil-peptidase I (C01.070)
Tripeptidil-peptidase (EC 3.4.14)	Tripeptidil-peptidase I (S53.003)
Carboxipeptidase (EC 3.4.16-18)	Carboxipeptidase A1 (M14.001)
Peptidil-dipeptidase (EC 3.4.15)	Peptidil-dipeptidase A (XM02-001)
Dipeptidase (3.4.13)	Dipeptidase A (C69.001)
Ômega-peptidase (EC 3.4.19)	Piroglutamil peptidase (C15.010)

Essas diferenças na especificidade da posição de hidrólise são importantes para a escolha da peptidase, de acordo com o substrato e o produto de hidrólise desejado. A mesma proteína pode gerar diferentes hidrolisados de acordo com a enzima escolhida para digeri-la.

O mais recente critério de classificação das peptidases é baseado na estrutura molecular e na homologia entre as peptidases, e isto foi possível devido aos avanços dos estudos de química de proteínas, como a cristalografia, estudos comparativos da sequência primária, dos aminoácidos do centro ativo assim como da estrutura tridimensional das peptidases. Esta classificação foi apresentada por Rawlings e Barrett (1993), que estabeleceram linhas evolutivas baseadas na comparação das sequências dos domínios importantes para a atividade. Desta forma, cada peptidase é designada como uma espécie e recebe um identificador, como, por exemplo, S01.001, o identificador da quimotripsina. Cada espécie de peptidase pode ser detectada em muitos organismos, com pequenas variações esperadas, neste caso estas são espécies variantes da primeira encontrada. Espécies proteicas possuindo sequências com semelhança estatisticamente relevante foram, então, alocadas em famílias.

A família é um grupo de peptidases baseada na homologia da sequência, e uma família pode conter uma única peptidase se nenhuma peptidase homóloga for conhecida. Cada família é representada pela letra que representa seu tipo catalítico (S, C, T, A, G, N ou M para serina, cisteína, treonina, aspártico, glutâmico,

asparagina ou metalo peptidase, respectivamente, ou U para peptidases cujo tipo catalítico é desconhecido) e por um número arbitrário. Por sua vez, as famílias que aparentam ter um ancestral comum, ou por causa da estrutura quaternária ou devido a resíduos no sítio ativo, foram agrupadas em clãs (Rawlings, Morton e Barrett, 2007).

Cada clã apresenta uma ou mais famílias e é identificado por duas letras, sendo a primeira representando o sítio catalítico das famílias incluídas no clã: A para aspártico peptidase, C para cisteína peptidase, M para metalopeptidase, S para serina peptidase, T para treonina peptidase, N para asparagina peptidase e G para glutâmico peptidase. A letra P é atribuída a clãs que possuem famílias de mais de um tipo catalítico. Alguns clãs são divididos em subclãs quando existe a evidência de divergência evolutiva dentro do clã. O mesmo pode acontecer com as famílias.

Por exemplo, a espécie subtilisina Carlsberg, uma peptidase produzida por *Bacillus licheniformis* Carlsberg, é classificada como S08.001; ela pertence à subfamília S8A (denominada subfamília da subtilisina), que pertence à família S8 (família da subtilisina). Esta família está incluída no clã SB (MEROPS, 2012). A Figura 9.2 sumariza a classificação das peptidases.

Classificação das peptidases

Mecanismo químico de catálise	Tipo de reação catalizada	Classificação estrutural
Asparagina peptidase Aspártico peptidase Cisteína peptidase Glutâmico peptidase Metalopeptidase Serina peptidases Treonina peptidase	Endopeptidase Aminopeptidase Dipeptidil-peptidase Tripeptidil-peptidase Carboxipeptidase Peptidil-dipeptidase Dipeptidase Ômega-peptidase	**Famílias:** S – serina peptidase C – cisteína peptidase T – treonina peptidase A – aspártico peptidase G – glutâmico peptidase N – asparagina peptidase M – metalo peptidase U – tipo desconhecido **Clãs** A; C; M; S; T; N; G; p (mais de uma família)

FIGURA 9.2 **Classificação geral das enzimas peptidases.**

9.2.2. Micro-organismos produtores de peptidases

As peptidases podem ser obtidas a partir de plantas, animais e micro-organismos. As plantas são fontes de algumas peptidases conhecidas como papaína, bromelina e ficaína (ficina). A papaína é uma cisteína peptidase extraída do látex do

mamoeiro (*Carica papaya*) e foi isolada pela primeira vez em 1879. A produção de papaína é longa e a qualidade da enzima obtida depende do local da cultura de mamão. Os melhores extratos enzimáticos brutos de papaína são obtidos em regiões com umidade constante ao longo do ano. Bromelina é o nome dado às peptidases encontradas no suco do abacaxi (*Ananas comosus*) e ficaína é a peptidase extraída de látex da planta *Ficus* glabrata (figueira-brava), podendo também ser encontrada em outras espécies do gênero como *F. carica* e *F. elástica*. A produção de peptidases de plantas depende da seleção da área climática, além de encontrar como principal dificuldade a baixa concentração da enzima nos tecidos vegetais, levando à necessidade de processamento de uma grande quantidade de material vegetal (Grzonka *et al.*, 2007; Jisha *et al.*, 2013).

Dentre as peptidases de origem animal, as mais conhecidas são a tripsina pancreática, quimotripsina, pepsina e renina. Estas peptidases são enzimas digestivas e foram muito utilizadas na indústria de detergentes e de laticínios, e, devido às dificuldades de obtenção de enzimas em fontes animais, vêm sendo substituídas por enzimas de origem microbiana (Claverie-Martín e Vega-Hernández, 2007; Jisha *et al.*, 2013).

As peptidases de origem microbiana são as preferidas para a exploração comercial por apresentarem uma série de vantagens sobre as peptidases de origem vegetal e animal, como a facilidade de cultivo, rápida taxa de crescimento dos micro-organismos, possibilidade de controle de todos os parâmetros que afetam a produção, disponibilidade de ferramentas e facilidade na manipulação genética de micro-organismos, não dependência das condições climáticas, maior produtividade, entre outras (Vermelho *et al.*, 2008; Mazotto, 2011). As peptidases microbianas também apresentam frequentemente estabilidade a pH ácidos ou alcalinos, a extremos de temperatura, solventes, quelantes e surfactantes. Diante de tantas vantagens é compreensível que dois terços da produção mundial de enzimas correspondam a enzimas microbianas e destas 60% correspondem a peptidases (Jisha *et al.*, 2013). Os dois principais grupos microbianos produtores de peptidases industriais são os fungos e as bactérias.

Várias espécies de fungos são reportadas como produtoras de proteases. A produção por estes micro-organismos oferece algumas vantagens operacionais como a facilidade de separação dos micro-organismos do meio de cultura através de filtração simples e a possibilidade de produção através do processo de fermentação em estado sólido. Os fungos que mais de destacam na produção de peptidases são aqueles pertencentes aos gêneros *Aspergillus*, outros gêneros também são conhecidos produtores de peptidases como *Penicillium*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Humicola*, *Thermoascus*, *Thermomyces*, *Fusarium*, entre outros. As peptidases produzidas por *Aspergillus* são as mais estudas e exploradas devido à capacidade deste fungo em secretar altos níveis de enzimas (Souza *et al.*, 2015). Como exemplos deste gênero podemos citar *A. niger* (Dubey *et al.*, 2010), *A. flavus* (Kranthi *et al.*, 2012), *A. fumigatus* (Wang *et al.*, 2005), *A. oryzae* (Vishwanatha *et al.*, 2010).

As peptidases produzidas por bactérias são as mais importantes comercialmente, sendo empregadas na indústria de detergentes, alimentos, couro e têxtil devido a sua alta capacidade catalítica e estabilidade em altos valores de pH e temperatura.

Bactérias do gênero *Bacillus* são as principais produtoras de peptidases comerciais e vários produtos comerciais são baseados em peptidases de *Bacillus* como Alcalase, Savinase, Esperase e Durazym (Novozymes), Maxacal, Maxatase e Maxapem (Gist-brocades), Opticlean e Optimase (Solvay Enzymes GmbH), Proleather e Protease P (Amano Pharmaceuticals) e Purafect (Genencor International).

Várias espécies de cepas de *Bacillus* são reportadas como produtoras de peptidase com aplicação industrial. Como exemplos, podemos citar: *B. amyloliquefaciens* (Son e Kim, 2002), *Bacillus subtilis* (Mazotto *et al.*, 2010), *B. licheniformis* (Ageitos *et al.*, 2007; Mitsunaga *et al.*, 2015), *B. cereus* (Uyar *et al.*, 2011), *B.circulans* (SARI *et al.*, 2015), *B. firmus* (Wishard *et al.*, 2014), *B. coagulans* (Ram *et al.*, 1994), *B. megaterium* (Yossana *et al.*, 2006), *B. proteolyticus* (Majeed *et al.*, 2013), *B. pumilus* (Jaouadi *et al.*, 2008), *B. intermedius* (Velishaeva *et al.*, 2008), *B. sphaericus* (Liu *et al.*, 2010).

Outros procariotos também produzem peptidases, especialmente actinobactérias. A Tabela 9.3 mostra alguns exemplos de bactérias e archaea produtoras de peptidases.

Tabela 9.3

Alguns exemplos de bactérias produtoras de peptidases

Micro-organismos	Referência
Bacillus amyloliquefaciens	Son e kim, 2002
Bacillus subtilis	Mazotto *et al.*, 2010
Bacillus licheniformis	Meissner *et al.*, 2015
Brevibacterium linens	Shabbiri *et al.*, 2012
Flavobacterium YS-80	Zhang *et al.*, 2011
Lactobacillus helveticus	Beganović *et al.*, 2013
Nocardiopsis Alba	Gohel e Singh, 2015
Microbacterium liquefaciens	Kanayama e Sakai, 2005
Pseudomonas fluorescens	Martins *et al.*, 2015
Pseudoalteromonas sp. 129-1.	Wu *et al.*, 2015
Pseudomonas aeruginosa HY1215.	Hao e Sun, 2015
Stenotrophomonas maltophilia	Ribitsch *et al.*, 2012
Stenotrophomonas maltophilia	Wang *et al.*, 2015a
Streptomyces sp. AH4.	Touioui *et al.*, 2015
Streptomyces sp. DP2.	Bajaj *et al.*, 2011
Streptomyces griseus	Ling *et al.*, 2013
Streptomyces koyangensis TN650	Ben *et al.*, 2015
Streptomyces malaysiensis AMT3	Nascimento *et al.*, 2011
Streptomyces flavogriseus HS1	Ghorbel *et al.*, 2014
Thermococcus kodakarensis KOD1.	Koga *et al.*, 2014
Thermoactinomyces sp. CDF	Wang *et al.*, 2015b
Thermoactinomyces sp. RS1	Wang *et al.*, 2015b
Vibrio metschnikovii NG155.	George *et al.*, 2014

Nascimento *et al.* (2011) observaram a produção de peptidases pela linhagem *Streptomyces malaysiensis* AMT-3 utilizando casca de malte cervejeiro ("dreche" cervejeiro – BSG) e milhocina (CSL) como matérias-primas. A detecção da atividade foi realizada *in situ* através da técnica de zimografia utilizando gelatina como substrato para detecção da atividade de peptidase. Foi possível observar que a melhor condição foi quando 2,5% (p/v) BSG e 0,1% (p/v) CSL foram utilizados, ao fim de 5 dias de fermentação. Através da análise dos géis de eletroforese, foi possível determinar a influência da concentração de BSG e CSL na produção da atividade de peptidase. Quando se utilizou a condição 0,5% (p/v) BSG e 1,2% (p/v) CSL, a atividade de peptidase foi detectada apenas ao fim de 6 dias de fermentação, ao contrário de outras condições que com 4 dias já era possível observar atividade de peptidase (Figura 9.3).

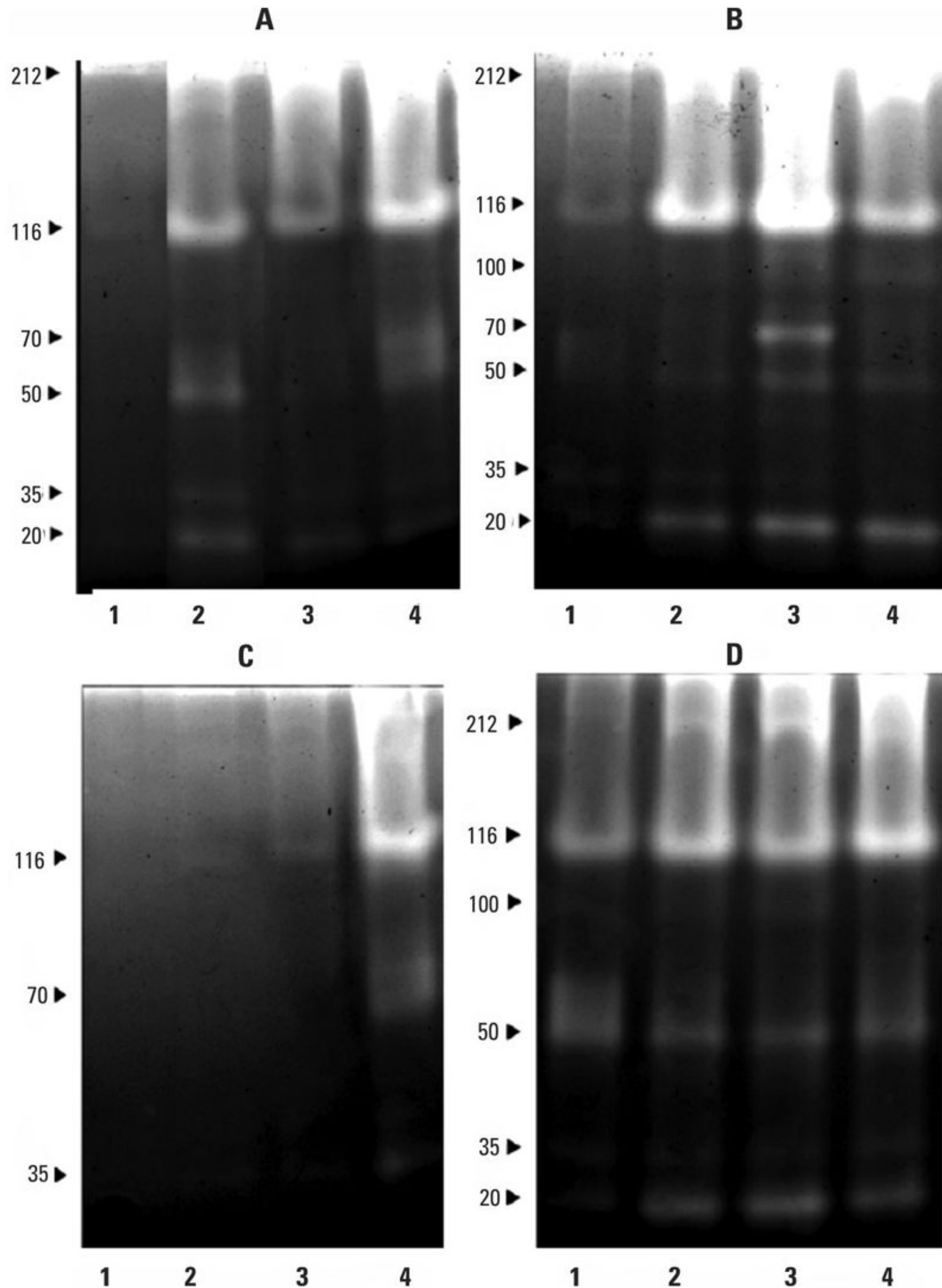


FIGURA 9.3 **Cinética de produção de peptidases pela actinobactéria *S. malaysiensis* AMT-3 em gel de eletroforese (SDS-PAGE) contendo gelatina (0,1% p/v). (A) 0,5% (p/v) BSG + 0,1% (p/v) CSL; (B) 2,5% (p/v) BSG + 0,1% (p/v) CSL; (C) 0,5% (p/v) BSG + 1,2% (p/v) CSL; (D) 2,5% (p/v) BSG + 1,2% (p/v) CSL. As linhas 1 a 4 representam os tempos de 3, 4, 5 e 6 dias, respectivamente.**

9.2.3. Aplicação industrial de peptidases

As peptidases têm grande importância biológica, médica e biotecnológica, e constituem um produto com alto valor agregado, podendo participar de diversos processos industriais, como na indústria de detergentes, alimentícia, farmacêutica, têxtil, entre outras. Elas são mais frequentemente utilizadas em misturas do que purificadas. Muitos livros e revisões descrevem as diversas aplicações das peptidases (Rao *et al.*, 1998; Gupta *et al.*, 2002; Grzonka, 2007, Donlon, 2007; Jisha *et al.*, 2013, Vermelho *et al.*, 2008, Arshad *et al.*, 2014). Os principais setores que utilizam enzimas industriais estão ilustrados na Figura 9.4.

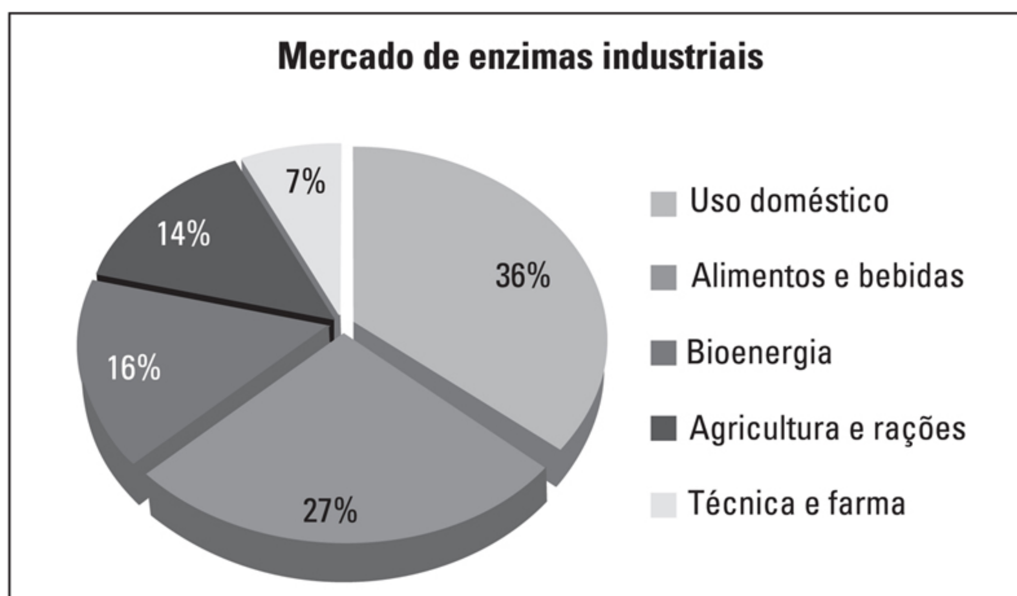


FIGURA 9.4 Mercado mundial de enzimas industriais. *Fonte*: Dados obtidos em report2013.novozymes.com/strategy--performance/sales-and-markets.

Dentre as peptidases industriais, destacam-se as peptidases alcalinas produzidas por bactérias do gênero *Bacillus*, cujas aplicações têm aumentado acentuadamente devido à capacidade de produção destes micro-organismos e à alta atividade catalítica das peptidases por eles produzidas (Joo e Chang, 2006). O interesse nas peptidases de origem microbiana de forma geral deve-se ao fato de que as peptidases de plantas e animais não atendem à demanda mundial (Gupta *et al.*, 2002; Vermelho *et al.*, 2008).

As peptidases são utilizadas nos seguintes setores industriais:

Detergentes. A indústria de detergentes é a que mais consome peptidases, sendo a subtilisina a principal delas. A subtilisina é uma serina peptidase comercialmente produzida por bactérias do gênero *Bacillus*, especialmente por *B. licheniformis*, *B. lentus*, *B. alcalophilus* ou *B. amyloliquefaciens*. Vários extratos enzimáticos comerciais são subtilisinas como Alcalase, Savinase Everlase, Esperase, Kannase, produzidas pela empresa Novozymes, e Purafect, Purafect OxP, Properase, da Genencor. As

características desejáveis para aplicação de peptidases em detergentes incluem a estabilidade em pH alcalino e temperatura relativamente alta, assim como manter a atividade na presença de surfactantes e agentes sequestrantes e clareadores.

Panificação. São utilizadas na redução do teor de proteínas das farinhas no preparo de massas. A redução na quantidade de glúten nas massas acelera o preparo de biscoitos, deixa a massa mais relaxada, evitando o encolhimento em massas de tortas e melhorando o volume em massas de pães.

Cervejaria. O uso de peptidase evita a turvação da cerveja durante a estocagem. Muitos dos ingredientes utilizados na produção de cerveja possuem proteínas, como o malte. Durante a refrigeração da cerveja, as proteínas presentes precipitam deixando-a turva. Como os consumidores preferem cervejas claras, peptidases são utilizadas na hidrólise destas proteínas.

Laticínios. As peptidases são utilizadas para a obtenção de hidrolisados de soro de leite, redução de sabor amargo, na fabricação e na maturação de queijo. A quimosina e renina são enzimas de origem animal usadas por muitos na produção de queijo como agente coagulador, cuja função específica é hidrolisar a κ-caseína, permitindo a coagulação da caseína. Atualmente a hidrólise de caseína na produção de queijo é feita por enzimas produzidas por micro-organismos.

Alimentos. A utilização de peptidases na indústria de alimentos possui inúmeras finalidades. As peptidases atuam como amaciante de carne; na produção de hidrolisados proteicos solúveis; aumentam o nível nutricional dos alimentos; alteram propriedades funcionais dos alimentos, como solubilidade, formação de espuma, coagulação, capacidade de emulsificação; atuam na remoção de amargor; previnem interações indesejadas que podem causar alterações com sabor ou odor; estabilizam a gelatina; removem fatores tóxicos, alergênicos ou inibitórios de proteínas. Na indústria alimentícia o uso da hidrólise enzimática ao invés de hidrólise química é muito importante, pois garante a obtenção de um hidrolisado definível, evita a destruição de alguns aminoácidos e não gera produtos tóxicos.

Tratamento de resíduos. Peptidases podem ser utilizadas na redução da viscosidade de efluentes, como agente desencrostrante, ou na degradação de proteínas complexas auxiliando na degradação das mesmas e redução da DBO dos efluentes.

Cosméticos e higiene pessoal. Ao serem incorporadas em produtos cosméticos servem para melhorar a funcionalidade em diversas aplicações, inclusive no campo da estética dermatológica, visando principalmente o rejuvenescimento e proteção cutânea, além do tratamento da acne e da caspa, dos amaciantes (peelings) e despigmentantes da pele, das tinturas capilares e os de ação antimicrobiana.

A descamação da pele é um processo balanceado da produção de novo de corneócitos e sua distribuição na superfície da pele. A proteólise dos corneodesmossomos é uma importante etapa na finalização deste processo. Na degradação destas moléculas de adesão a enzima tríptica do estrato córneo - SCTE (uma protease de serina expressa na epiderme) regula o processo de descamação, em conjunto com outras, degradando as proteínas formadoras das junções celulares no estrato córneo. Autores demonstraram que baixas concentrações de lauril éter sulfato de sódio num gel de banho poderia inativar esta enzima. Após a melhoria

da formulação cosmética, um teste utilizando pigmentos fluorescentes comprovou um significante aumento da atividade enzimática pós-aplicação da nova fórmula quando comparada aos géis de banho do mercado (SCHEPKY et al., 2004). Tratamentos enzimáticos para melhorar a textura e aspecto da pele, como o peeling, são bastante populares. Enzimas comuns como papaína e bromelina e peptidases especiais como a Arazyme são utilizadas em formulações cosméticas. As peptidases são capazes de decompor as proteínas da pele, por exemplo a tripsina é muito eficaz para peles oleosas e acneicas age diretamente na queratina (BRAZ & SAKUMA, 2012; KAPOOR & GUPTA, 2012).

Os inibidores de peptidases têm grande aplicação neste setor. As metaloproteases são potencialmente tóxicas para a pele. A exposição excessiva à radiação solar causa a destruição da trama de colágeno e elastina, que sustentam a epiderme. Estas fibras são responsáveis pela manutenção da maciez, elasticidade e juventude da pele. Enzimas inibidoras das metaloproteases são utilizadas em formulações para reduzir a atividade enzimática excessiva que degradam as fibras de colágeno e provocam o envelhecimento precoce (Jenn-Kan et al., 2016).

As peptidases são amplamente utilizadas como agentes limpantes de lentes de contato. Enzimas como a subtilisina são aplicadas para remoção de filmes de proteínas e outros artefatos das lentes de contato. Apesar de essa aplicação estar associada aos produtos para higiene e cuidados pessoais, os agentes limpantes não são considerados cosméticos de acordo com a legislação vigente na União Europeia (OOPEC, 2002).

Há relato na literatura sobre o isolamento de uma enzima específica bacteriana relacionada com o mau odor das axilas e sua utilização como um screening para o alvo de novas formulações desodorantes. A elucidação dos mecanismos enzimáticos da formação do mau odor leva a novos caminhos na pesquisa e desenvolvimento dos desodorantes. Enquanto as fórmulas clássicas atuam reduzindo ou eliminando a flora bacteriana residente, o novo alvo bloqueia o processo do mau cheiro e oferece a possibilidade de um tratamento eficaz sem eliminar a microflora da pele. Os autores demonstraram por meio de eventos bioquímicos in vitro que a formulação age sintetizando inibidores de metalopeptidases específicos para a enzima, como um novo ingrediente "inteligente" capaz de liberar fragrância, ao invés do mau cheiro (Natsch *et al.*, 2005).

Têxtil. Na indústria têxtil as peptidases podem ser utilizadas no processamento de lã e de seda, prevenindo o encolhimento do tecido e aumentando a maciez e brilho.

Indústria de couro. Podem ser utilizadas como agente depilatório em substituição ao sulfito de sódio e à cal que são tradicionalmente utilizados em cortumes e responsáveis pela principal fonte de poluição destas indústrias.

Ração animal. As enzimas são muito utilizadas como aditivos em rações e/ou durante sua preparação. Em particular, as peptidases aumentam a digestibilidade e disponibilidade de proteínas nas rações. Além de reduzir o custo com ingredientes em rações, o uso de enzimas também permite a exploração de novas fontes de proteínas para a alimentação animal.

Utilização de subprodutos ou resíduos. Uma recente aplicação para as peptidases é a sua utilização no aproveitamento de resíduos ricos em proteínas. Como exemplo pode-se citar as queratinases, peptidases que têm a queratina como substrato. A queratina está presente dos tecidos epiteliais e seus anexos, como pelos, unhas, bico, chifre, casco, penas, entre outros. As penas possuem em sua composição 90% de proteínas, que é pouco utilizada devido a sua estrutura físico-química que dificulta sua degradação por peptidases comuns e agentes químicos. Entretanto a queratina é hidrolisada por queratinases, e o produto de hidrólise da queratina é aplicável como aditivo alimentar, na indústria cosmética e de polímeros.

Indústria química. Peptidases são utilizadas na síntese de aminoácidos e aspartame, compostos antitumorais e peptídeos bioativos, entre outros.

Indústria farmacêutica e medicina. Várias atividades teraupêuticas vêm sendo associadas às peptidases. Estas enzimas podem ser empregadas na desagregação de plaquetas, como agente fribrinolítico, agente anti-inflamatório, agente imunomodulatório, no tratamento de queimados, no aumento de absorção de drogas, no tratamento de acne, como agente mucolítico, auxiliar na digestão, como anti-helmíntico. Peptidases também podem ser utilizadas no preparo de vacinas, como a vacina antitetânica e na produção de imunoglobilinas. Peptidases também vêm sendo investigadas quanto à utilização no tratamento de doenças neurodegenerativas como Parkinson e Alzheimer.

9.3. Amilases

O amido é um polímero natural, renovável e biodegradável, representa uma fonte abundante de energia disponível encontrado em praticamente todas as plantas superiores (Shannon *et al.*, 2009; Le Corre *et al.*, 2010; Vaidya *et al.*, 2015). No amido existem dois tipos de polímeros de glicose que são a amilose e a amilopectina. A amilose é um polímero composto por moléculas de glicose, através de ligações do tipo α 1-4. A amilopectina também é formada por ligações do tipo α1 -4, porém nos pontos de ramificações temos ligações do tipo α1 -6, sendo este último, o maior componente da molécula de amido (Figura 9.5) (ZEEMAN et al., 2010).

A amilose é um dos componentes da amilopectina, o maior componente da molécula de amido (Figura 9.5) (Zeeman *et al.*, 2010).

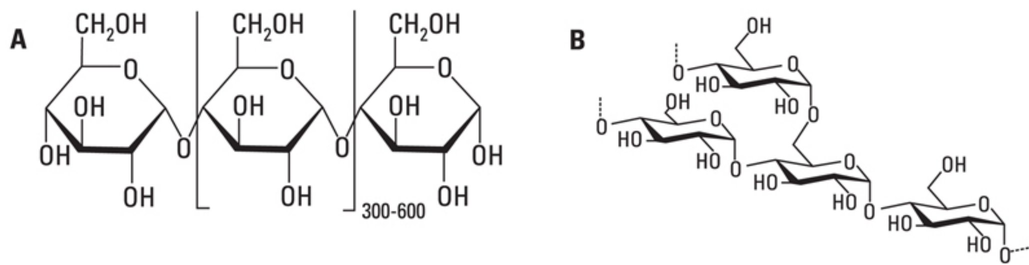


FIGURA 9.5 Polímero de glicose presente em moléculas de amido: A. amilose e B. amilopectina.

As amilases são carboidrases que hidrolisam as ligações glicosídicas α-1,4 e/ou α-1,6 encontradas no amido, no glicogênio e nos derivados de sacarídeos e podem ser subdivididas pela especificidade de acordo com o substrato em que atuam (Koblitz, 2008). As endoamilases, das quais as mais estudadas são as α-amilases (α-1,4 D-glucan-glicanohidrolase EC 3.2.1.1), clivam ligações internas α-1,4 em amilose e amilopectina, liberando dextrinas de vários tamanhos (Ryan *et al.*, 2011; Vermelho *et al.*, 2013). As exoamilases atuam em regiões externas do substrato de grandes cadeias, hidrolisando ligações do tipo α-1,4, produzindo glicose, maltose e β-dextrina, e são subdivididas em β-amilase ou maltase (α α-1,4 D-glucan-maltohidrolase EC 3.2.1.2), γ-amilase, glicoamilase ou amiloglicosidade (α-1,4 D-glucan-glicohidrolase EC 3.2.1.3) e α-glicosidase (α-D-glucosídeo-glucohidrolase EC 3.2.1.20) (Castro e Ribeiro, 2013). Algumas amilases são denominadas enzimas desramificadoras, que agem sobre as ligações α-1,6, removendo as ramificações que formam a amilopectina. Entre elas estão as pululanases (α-dextrina-6-glicohidrolase EC 3.2.1.41), que atuam na pululana, no glicogênio e na amilopectina, liberando exclusivamente a maltotriose; as isoamilases (Glicogênio-6-glucanohidrolase EC 3.2.1.68), que também atuam sobre a pululana, porém, liberando malto- 11 oligossacarídeos com duas unidades de glicose; e as dextrinases (dextrin 6-α-glucanohidrolase EC 3.2.1.142) que atuam liberando

oligossacarídeos do tipo maltose, similar às isoamilases (Castro e Ribeiro, 2013). Um quarto grupo são as amilases denominadas transferases que são amilases que clivam ligação glicosídica α-1,4 da molécula doadora e formam uma nova ligação glicosídica por transferência de uma parte da molécula do doador para um aceptor glicosídico, com a formação de uma nova ligação glicosídica. Neste grupo se encontram as enzimas como amilomaltase (4-α-glucanotransferase EC 2.4.1.25), ciclodextrina-glicotransferase (1,4-α-D-glicopiranosiltransferase EC 2.4.1.19) e a enzima de ramificação transglicosidase (amilo- (1,4-1,6)–transglicosilase; EC 2.4.1.18) (Said e Pietro, 2014). Os quatro grupos de amilases acima referidos, juntamente com seus locais de ação no polímero de amido, são mostrados abaixo (Figura 9.6).

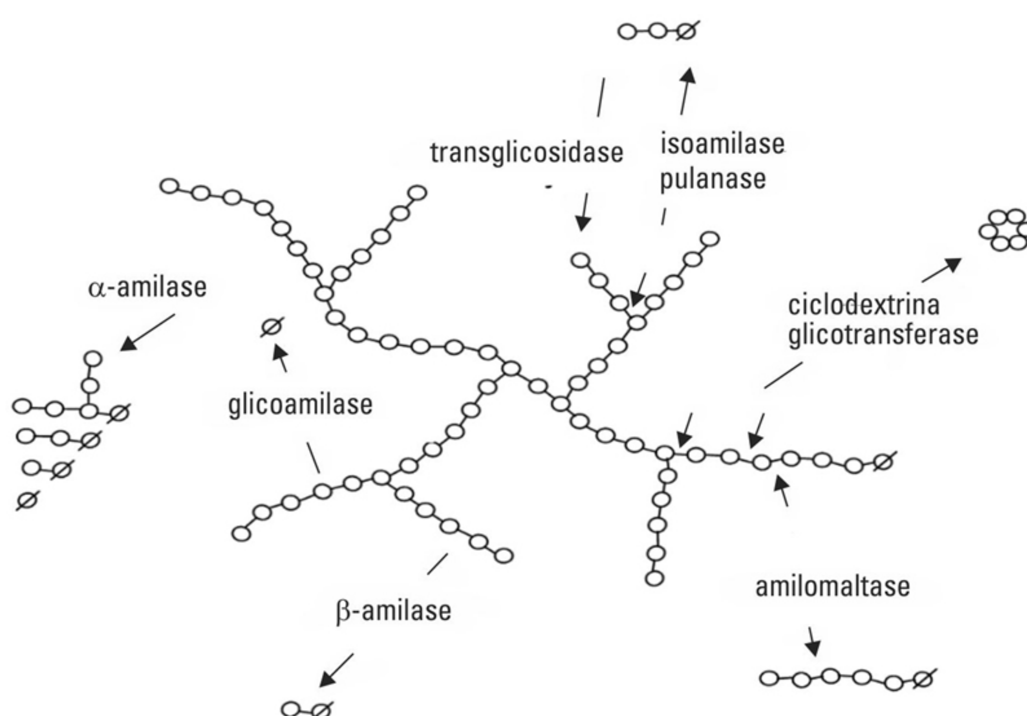


FIGURA 9.6 Representação esquemática do local de ação das enzimas amilolíticas. Moléculas de glicose são indicadas pelos círculos abertos enquanto as extremidades reduzidas são marcadas pelos círculos cortados. *Fonte*: Adaptado de Turner *et al.* (2007).

9.3.1. Micro-organismos produtores de amilases

Ao longo dos anos diversas enzimas termoestáveis e halotolerantes provenientes de termófilos, psicrófilos, alcalófilos, acidófilos e halófilos de bactérias, árqueas e fungos têm sido registrada (Siddiqui *et al.*, 2005; Kuddus *et al.*, 2011; Naidu e Saranraj, 2013; Sharma e Satyanarayana, 2013).

Dentre as amilases mais utilizadas em processos biotecnológicos, as α-amilases bacterianas de diferentes espécies do gênero *Bacillus* possuem inúmeras aplicações, devido a suas propriedades termofílicas e elevada taxa de conversão, além de serem facilmente manipuladas visando a obtenção de enzimas termoestáveis (Haki e Rakshi, 2003; Prakash e Jaiswal, 2010). *Bacillus subtilis*, *B. licheniformis*, *B. stearothermophilus* e *B. amyloliquefaciens* são as espécies conhecidas por serem boas produtores de α-amilase (Tomazic; Klibanov, 2003; Sivaramakrishnan *et al.*, 2006; Konsoula, 2007; Liakopoulou-Kyriakides, 2007; Souza e Magalhães, 2010; Jisha *et al.*, 2013).

Micro-organismos halotolerantes cada vez mais são reportados em aplicações industriais, uma vez que possuem uma ótima atividade em concentrações elevadas de sal, onde a maioria das conversões enzimáticas seria inibida devido à alta salinidade. Além de serem intrinsecamente estáveis e ativas em elevadas concentrações de sal, as enzimas halotolerantes são também ativas em altas temperaturas, em amplo intervalo de pH e em solventes orgânicos (Amoozegar *et al.*, 2003; Mohapatra *et al.*, 2003; Prakash *et al.*, 2009; Souza e Magalhães, 2010; Oren, 2010; Li e Yu, 2011). *Chromohalobacter* sp. (Prakash *et al.*, 2009), *Halobacillus* sp. (Amoozegar *et al.*, 2003), *Haloarcula hispanica* (Hutcheon *et al.*, 2005), *Halomonas meridian* (Coronado *et al.*, 2000) e *Bacillus dipsosauri* halotolerante (Deutch, 2002), *Haloarcula hispanica* (Hutcheon *et al.*, 2005), *Haloarcula* sp. cepa S-1 (Fukushima *et al.*, 2005), *Haloferax mediterranei* (Perez-Pomares *et al.*, 2003); *Desulfurococcus mucosus* (Bertoldo e Antranikian, 2002) são exemplos de bactérias e archeas halotolerantes produtoras de amilases.

A maioria das amilases fúngicas são amilases de micro-organismos isolados de solo, que crescem em condições mesófilicas (Gupta *et al.*, 2003; Souza e Magalhães, 2010). As amilases fúngicas são produzidas principalmente por diferentes espécies de *Aspergillus* e em menor escala por algumas espécies de *Penicillium*, *Rhizopus* (Kathiresan e Manivannan, 2006; Souza e Magalhães, 2010). Entretanto, as amilases produzidas por espécies de *Aspergillus* são as enzimas mais utilizadas industrialmente (Hutcheon *et al.*, 2005). *Aspergillus oryzae* e *Aspergillus niger* produzem juntos a maioria das enzimas fúngicas que são usadas de forma abrangente na indústria (Souza e Magalhães, 2010). *Aspergillus oryzae* é um hospedeiro promissor para a expressão heteróloga de proteínas devido à sua capacidade de secretar uma grande quantidade de enzimas extracelulares, tais como amilases, enquanto *A. niger* tem chamado a atenção devido a sua tolerância para crescer e produzir amilases em condições ácidas (pH <3), que evitam a contaminação bacteriana (Djekrif-Dakhmouche *et al.*, 2006).

9.3.2. Aplicações industriais

As amilases representam grande parte do mercado de enzimas devido à sua vasta área de aplicações com grande potencial biotecnológico (Gupta *et al.*, 2003; Anbu *et al.*, 2015). Uma variedade de micro-organismos produzem enzimas extracelulares ou intracelulares que convertem o amido ou glicogênio em produtos mais simples, os quais podem ser utilizados por eles como fontes de energia e de carbono. Fontes

microbianas de amilases foram e são exploradas imensamente para a produção industrial devido às diversas vantagens que oferecem (Sivaramakrishnan *et al.*, 2006; Anbu *et al.*, 2015; LALL *et al.*, 2015). As vantagens principais de usar fontes microbianas de amilases são sua rentabilidade, economia em produção em massa, e requererem menos tempo e espaço. Além disso, os micro-organismos são fáceis de manipular a fim de obter enzimas com as características desejadas (Gupta *et al.*, 2003; Bozic *et al.*, 2011; Santos *et al.*, 2012).

As α-Amilases são o segundo tipo de enzimas usadas em formulações de detergentes enzimáticos e estas auxiliam na degradação de resíduos ricos em amido (Souza e Magalhães, 2010). O pH ótimo de atividade das α-amilases varia de 2.0 para 12,0 e, assim, se torna adequado a diferentes aplicações industriais, tais como amilases neutras e ácidas em sacarificação do amido e alimentos industriais, enquanto a amilase alcalina é o pré-requisito para as indústrias de detergentes (Sharma *et al.*, 2013, Gupta *et al.*, 2003). Recentemente, uma α-amilase poliextremofílica de *Aspergillus penicillioides* halofílico foi purificada e caracterizada, e apresentou uma especificidade superior (80%) em relação às amilases já utilizadas comercialmente na indústria de detergentes (Ali *et al.*, 2014). Outros gêneros de bactérias amilolíticas foram revisados por Sun *et al.* (2010), entretanto, dada a severidade dos processos industriais, tem-se ampliado as buscas por enzimas resistentes em micro-organismos extremófilos (Feller e Gerday, 2013).

Outro grupo muito interessante de amilases são as ciclodextrinas glicosiltransferases, que produzem compostos glicosilados com capacidade de encapsulamento em nível molecular de grande número de moléculas orgânicas, possuindo a propriedade de estabilizar compostos voláteis, desodorizar fármacos e alimentos, proteger princípios ativos contra oxidação e fotodegradação, aumentar a solubilidade de medicamentos insolúveis em água, aumentando a solubilidade e diminuindo o amargor de alimentos e fármacos (Kitayska *et al.*, 2011).

Com o aumento constante dos custos das matérias-primas tradicionais e a possibilidade de substituição por ingredientes alternativos considerados de menor qualidade, o uso de enzimas exógenas torna-se uma forma eficiente de aumentar a rentabilidade, sem afetar os requerimentos nutricionais e continuar garantindo o alto padrão de eficiência do agronegócio brasileiro. (Matias *et al.*, 2015; Brandell *et al.*, 2015). A suplementação com enzimas exógenas tem a finalidade de melhorar a digestibilidade dos nutrientes, a eficiência de enzimas endógenas e, com isso, maior obtenção de energia das dietas. É o caso da amilase, cujo substrato é o amido, principal componente de grãos que compõem a ração de aves e suínos. Outra característica fundamental desta enzima é a termoestabilidade, sobrevivendo a processos térmicos, como os de peletização da ração (Tavaernari *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2010).

Para a produção de bioetanol, o substrato preferido é o amido, devido ao seu baixo preço e facilidade de disponibilidade de matérias-primas em muitas partes do mundo. O processo convencional para sua produção envolve a solubilização de amido por aquecimento e subsequente tratamento com enzimas, tais como glucoamilases e α-amilases para obter açúcares fermentáveis. Assim, leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) convertem o açúcar em etanol por fermentação (Öner,

2006). Esforços têm sido feitos para manipular estirpes microbianas que sejam capazes de produzir etanol de forma eficiente e que possam sobreviver às mais elevadas concentrações de etanol (o maior obstáculo na produção de bioetanol) (Mobini-Dehkordi *et al.,* 2008).

Diversos outros processos industriais já bem descritos por muitos autores podem ser realizados com o uso de amilases. Entre estes processos estão a produção de xaropes de glicose, frutose e maltose, redução da viscosidade de xaropes, redução da turbidez de sucos, fermentação de álcool, para a indústria alimentícia, como também, realizam processos importantes na indústria têxtil, papeleira, petrolífera e de biorremediação (Sivaramakrishnan *et al.,* 2006; Kyaw *et al.,* 2010; Nghiem *et al.,* 2011; Shafiei *et al.,* 2011; Naidu e Saranraj, 2013; Vermelho *et al.,* 2013).

9.4. Transglutaminases

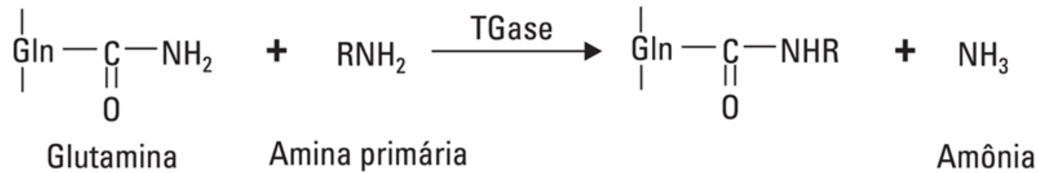
Transglutaminases (TGase; E.C. 2.3.2.13) são transferases que possuem ampla distribuição, podendo ser encontradas em vertebrados e invertebrados em geral, tecidos de mamíferos, nas plantas e nos micro-organismos (Yasueda *et al.*, 1994, Martins *et al.*, 2014).

As transglutaminases compreendem um grupo de pelo menos nove tipos de enzimas. São enzimas indutíveis, podem ser cálcio dependente ou independente (principalmente as microbianas) e ocorrem em muitas isoformas. Têm sido o alvo de investigações científicas devido a seus importantes papéis fisiológicos como na coagulação, catalisando ligações cruzadas entre as moléculas de fibrina, reações imunes contra bactérias e na fotossíntese e inúmeras aplicações industriais (Lorand *et al.*, 1966; Kieliszek e Misiewicz, 2014). Sua localização é variada e podem estar no citoplasma, membranas celulares ou tecidos e nos cloroplastos de plantas (Kczkowski, 2005). O foco deste tópico serão as transglutaminases microbianas.

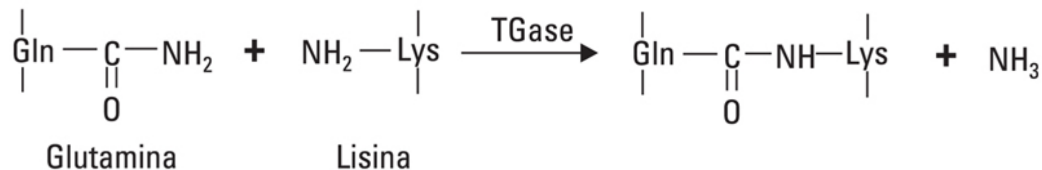
9.4.1. Reações catalisadas pelas transglutaminases

A principal reação das transglutaminase é a formação de ligações isopeptídicas entre a glutamina e a lisina de proteínas/peptídeos introduzindo ligações covalentes inter e intramoleculares. O ε-amino grupo de uma lisina, serve como aceptor do acil, uma ligação isopeptídica, ε-(γ-glutamil)-lisina, é formada. Estas ligações entre as proteínas resultam na formação de polímeros de alto peso molecular que são muito resistentes à quebra por peptidases e a danos mecânicos (Zhang *et al.*, 2009). Na presença de aminas primárias a transglutaminase também faz ligações cruzadas covalentes com a amina da glutamina de uma proteína, catalisando a transferência de uma acila de uma γ-carbonila (grupo γ-carboxamida) de uma glutamina para vários compostos contendo aminas primárias. Este tipo de ligação (transferência de grupo acila) introduz ligações covalentes nas proteínas e peptídeos. Por último, na ausência de lisina ou outras aminas primárias, a molécula de água pode reagir como um nucleófilo resultando na desaminação de glutaminas (Figura 9.7) (Rachel e Pelletier, 2014).

reação 1. Transferência de acila



reação 2. Formação de ligação isopeptídica



reação 3. Desaminação



FIGURA 9.7 Esquema indicando os diferentes tipos de reação, catalisadas pelas Transglutaminases.

As tranglutaminases podem ainda catalisar outras reações como as de nitrosilação e denitrosilação de grupos SH do aminoácido cisteína (Czkowski, 2005).

9.4.2. Micro-organismos produtores de transglutaminases (MTGases)

Na década de 1980, as transglutaminases comerciais eram obtidas de tecidos animais, como fígados do porco da índia, e devido às dificuldades de extração da enzima, ela chegava ao mercado com um alto preço. Desde 1990, muitas transglutaminases microbianas têm sido encontradas e usadas em aplicações comerciais, principalmente na indústria de alimentos.

As transglutaminases microbianas são excretadas para o meio de cultura e sua separação é bem mais fácil (Salis *et al.*, 2015). Normalmente tem baixa massa molecular, approx.38 kDa, é uma proteína monomérica, não glicosilada, sem lipídios com um ótimos de temperatura e pH a 40°C e 5.5 respectivamente.

A enzima reage com um número grande de substratos doadores de acila (Ho *et al.*, 2000; Abd-Rabo *et al.*, 2010; Yokoyama *et al.*, 2004).

Entre as actinobactérias, o gênero *Streptomyces* é capaz de produzir uma alta diversidade de MTGases com diferentes estruturas como o modo de realizar as ligações cruzadas (Langston *et al.,* 2007; Nagy e Szakacs, 2008). A primeira transglutaminase microbiana caracterizada foi da actinobactéria *Streptomyces mobaraensis* (previamente classificada como *Streptoverticillium mobaraensis*) (Ando *et al.,* 1989). *Enterobacter* sp. C2361 (Kim *et al.,* 2000), *Actinomadura* sp. (Bourneow *et al.,* 2001) e o grupo dos Bacilos são outros gêneros nos quais tem-se encontrado a presença de transglutaminases (Soares *et al.,* 2003). Além de isolar os micro-organismos produtores, é uma estratégia para aumentar a produção através de manipulação genética usando um micro-organismo hospedeiro como *Escherichia coli*, *Bacillus* sp, *Aspergillus* sp, *Pichia* sp e *Corynebacterium glutamicum* (Yokoyama e Kikuchi, 2006).

Em fungos estão ausentes ou raras de serem encontradas. Em *Candia albicans* e em *Saccharomyces cerevisiae* é descrita a participação de MTGases na formação de ligações covalentes na parede celular (Ruiz-Herrera *et al.,* 1995; Mazan e Farkas, 2007).

Atualmente as Transglutaminases têm sido descritas em procariotos do domínio Archaea (Makarova *et al.,* 1999), domínio Bacteria (Yokoyama e Kikuchi, 2001) e em leveduras (Herrera *et al.,* 1995). Proteínas homólogas à transglutaminase de animais foram encontradas nos domínios Archaea, Bacteria e Eucariotos através de estudos usando a bioinformática com o programa PSIBLAST (Makarova *et al.,* 1999). Embora as transglutaminases microbianas sejam muito utilizadas em aplicações industriais, sua função nos micro-organismos não é ainda muito estudada. Recentemente foi descrito que a bactéria *Streptococcus suis* é capaz de secretar uma transglutaminase que tem forte ação antifagocítica, e quando inativada reduz a virulência da cepa, utilizando o modelo de infecção animal em suínos (Yu e al., 2015). *Porphyromonas gengivalis* é o agente da periodontite e pode estar envolvida no desenvolvimento de doenças sistêmicas como arterioesclerose e artrite reumatoide. A bactéria possui uma transglutaminase que tem um papel crítico na aderência da *P. gengivalis* em células hospedeiras (Boisvert *et al.*, 2014).

É descrito na literatura que as MTGases podem se ligar a diversos substratos como caseína, gelatina, miosina, proteína do ovo, do trigo e da soja (Li *et al.,* 2013; Martins *et al.,* 2014).

9.4.3. Aplicações industriais

*Indústria de alimentos***.** Esta é atualmente a principal aplicação das transglutaminases devido à sua capacidade de catalisar ligações cruzadas entre proteínas. Matérias-primas alimentares, tais como carnes em geral, ovos, peixes e mariscos contêm um certo número de ligações Glutamina-Lisina (G-L). Em alimentos processados, como presunto e hambúrguer, a ligação G-L é maior. Durante o cozimento, essas ligações podem ser formadas, considerando que a Transglutaminase pode permancer ativa durante um tempo no calor, devido a isto alimentos cozidos têm mais ligações G-L também. O cozimento também provoca uma desidratação química entre o grupo γ–carboxila de glutamato e ε amino-grupo de lisina, aumentando as ligaçoes G-L

após a ingestão de alimentos tratados com a transglutaminases, as proteínas com ligação cruzada G-L resistem às enzimas digestivas gastrointestinais dos mamíferos. A proteína é clivada liberando peptideos com ligação G-L que será processada posteriormente por enzimas do rim.

Carne. Proteínas musculares como a miosina e actina podem ser reticuladas com as transglutaminases e são gelificadas. A capacidade de formação de gel das proteínas da carne e as ligações cruzadas, após a adição de MTGase, são um fator importante na preparação de presunto e embutidos (Kuraishi *et al.*, 1998). MTGases podem produzir carne restruturada, juntando pedaços e texturizando em temperaturas abaixo de 10°C, "overnight". Outra estratégia é tratar o caseinato com MTGases, o que o deixa viscoso, atuando como uma cola para juntar pedaços de carne bovina, de porco, frango e peixe (Motoki e Seguro, 1998).

Soja. As proteínas da soja de alto valor nutricional são bons substratos para a MTGase microbiana. No queijo tofu atualmente é adicionado a MTGase permitindo a manutenção da textura suave de Tofu aumentando sua qualidade e consistência. As proteínas de soja tratadas diretamente com a enzima, ou após proteólise limitada, tiveram um aumento em N solúveis e na capacidade emulsionante (Motoki e Seguro, 1998; Soeda, 2003). As MTGases também podem ser utilizadas para fazer a ligação cruzada da soja com outras proteínas como as de músculos.

Laticínios. Pode ser utilizado para melhorar a textura de iogurtes após aquecimento a 85°C por 15 min, se resfria a 43°C e se aciona a MTGase que será por sua vez inativada nas etapas posteriores (Yüksel e Erdem, 2010). A MTGase também torna possível produzir produtos lácteos, como sorvetes e queijo, com baixo teor de gordura (Yokoyama e Kikuchi, 2004). As proteínas do leite são sensíveis à ação das MTGases microbianas e não funcionam com outras MTGases. A polimerização de proteínas do leite com transglutaminase resulta na formação de um filme de proteína, que melhora as propriedades funcionais dos produtos lácteos (Rossa *et al.*, 2011). Creme e bebidas lácteas têm sua textura e qualidade aumentadas.

Biomateriais. A bioengenharia de tecidos é um campo amplo onde os princípios da engenharia e ciência da vida são utilizados para desenvolver substitutos biológicos para restaurar, manter ou aumentar a função de um tecido em um órgão. Estes estudos têm sido realizados em cultura de células vivas como, por exemplo, hepatócitos de bexigas artificiais (Brophyet *et al.*, 2006; Baumert *et al.*, 2007). Nesta pesquisa, as matrizes usadas para suporte são muito importantes, porque irão dar sustentação ao crescimento tridimensional das células. Embora as transglutaminases não contribuam com o crescimento do tecido, elas participam da construção destes suportes proteicos para o crescimento das células que precisam ser biocompatíveis, robustos e bioegradáveis. Suportes feitos com colágeno e transglutaminase microbianas estão sendo usados com sucesso para o crescimento de células de mamíferos. Com osteoblasto humano e fibroblasto foi observado um aumento da adesão e proliferação das células nos suportes tratados com a enzima (Chau *et al.*, 2000; Zhu e Tramper, 2008). Esta, sem dúvida, é uma área muito promissora.

Indústria têxtil e de couro. Na indústria têxtil as peptidases são usadas para melhorar as propriedades do tecido de um modo geral e a resistência ao encolhimento. Entretanto, às vezes, fibras proteicas como a lã podem ficar um pouco danificadas. As MTGases restauram a fibra após este tratamento e a resistência do tecido pode aumentar em até 25% (Du *et al.*, 2007).

No tratamento do couro que ocorre no seu processamento tem uma etapa chamada de enchimento que visa preencher falhas e vazios que existem entre as fibras, tornando a lâmina de couro mais homogênea, este preenchimento pode ser feito com glicose, amido, gelatina e caseína. As gelatinas tratadas com glutaraldeido ficam polimerizadas aumentando sua capacidade de enchimento e sua fixação no couro durante o processo de lavagem. O tratamento da transglutaminase microbiana com a gelatina deu resultados semelhantes e tem a vantagem de ser mais barata e muito menos tóxica e nociva para o ambiente (Taylor *et al.*, 2006; Zhu e Tramper, 2008).

9.5. Lipases

As lipases são biocatalisadores que, cada vez mais, vêm se destacando no cenário da tecnologia enzimática. São enzimas classificadas como glicerol éster hidrolases (E.C. 3.1.1.3), que catalisam classicamente a hidrólise de ligações éster carboxílicas presentes em triacilgliceróis, liberando diacilgliceróis, monoacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos (Figura 9.8).

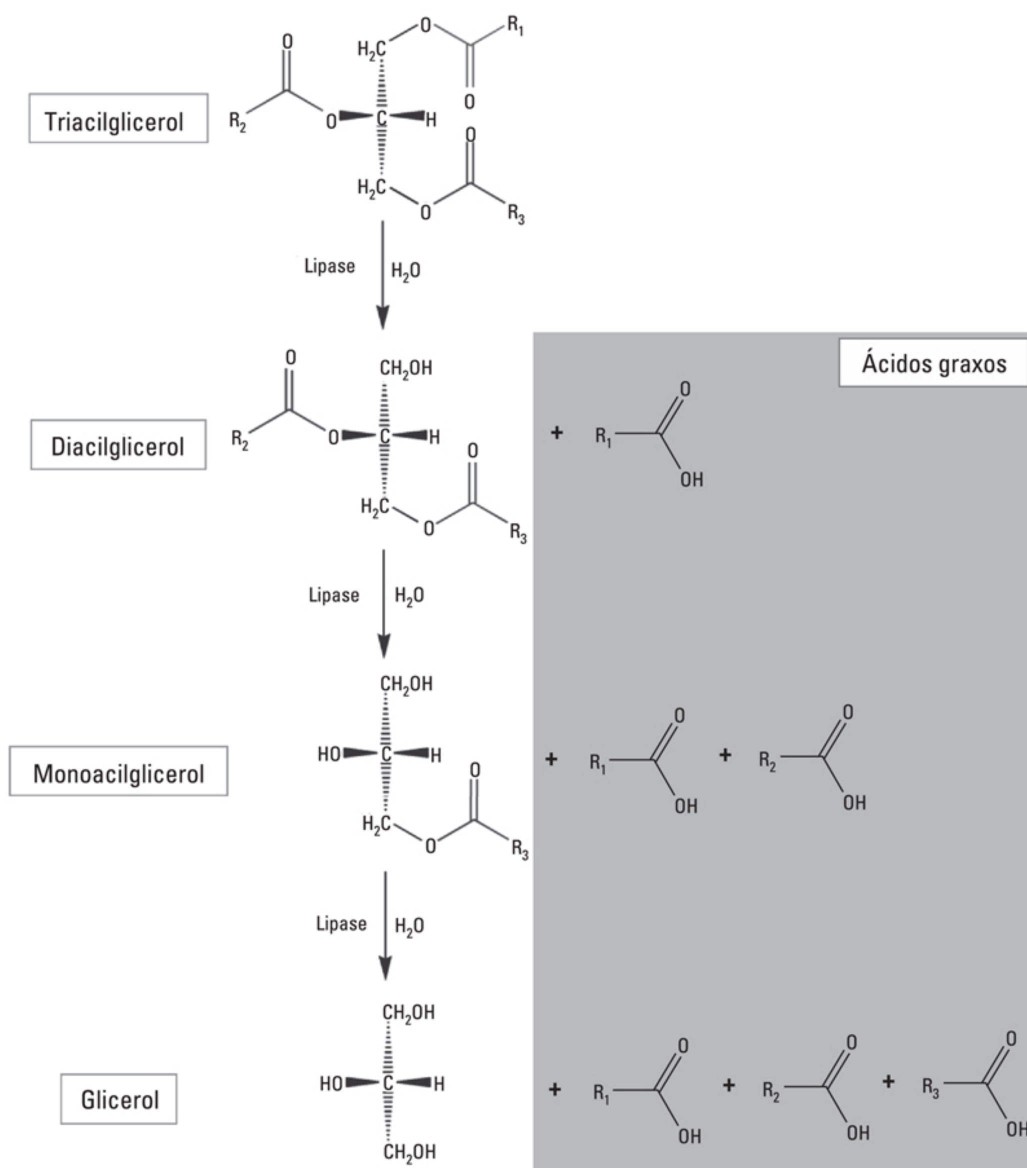
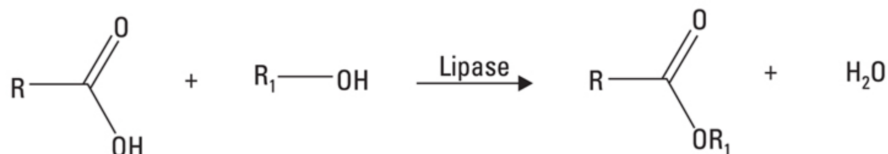


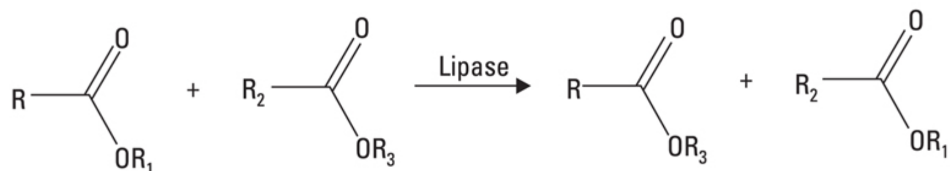
FIGURA 9.8 **Reação de hidrólise de triacilglicerol catalisada por lipase.**

Além de catalisarem naturalmente reações de hidrólise, as lipases também realizam reações reversas de síntese em ambientes aquorrestritos, como esterificação, transesterificação (acidólise, alcoólise, interesterificação) e aminólise (Jaeger e Hertz, 1998), como observado na Figura 9.9.

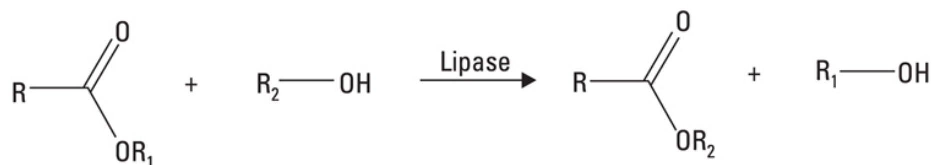
Esterificação



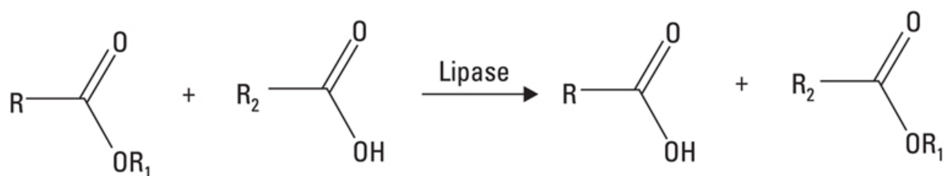
Interesterificação



Alcoólise



Acidólise



Aminólise

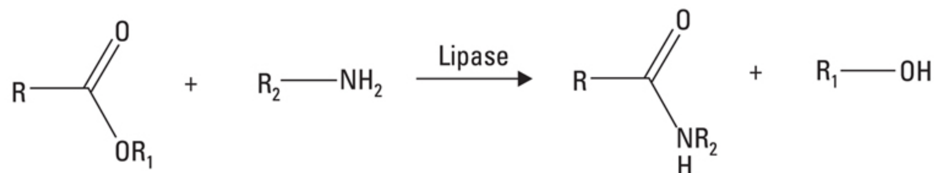


FIGURA 9.9 Reações de síntese catalisadas por lipases.

As lipases são enzimas comumente encontradas na natureza, sendo produzidas por diversas plantas superiores, como a mamona (*Ricinus communis*) e a canola (*Brassica napus*), por animais, sendo as de pâncreas de porco e de humano as mais estudadas, e por micro-organismos, sendo estes a principal fonte de enzimas utilizadas no campo da biotecnologia, graças à maior produtividade, alto

rendimento de conversão e maior facilidade de manipulação genética e de produção em larga escala (Freire e Castilho, Sharma *et al.*, 2001).

9.5.1. Mecanismo catalítico das lipases

Algumas lipases necessitam de uma interface orgânicoaquosa para que ocorra a sua atividade catalítica, permitindo que haja o fenômeno denominado de ativação interfacial. Logo, em substratos solúveis, nos quais não há a presença de interface, a atividade catalítica das lipases é muito baixa ou até mesmo nula, tendo sido essa, durante algum tempo, a principal forma de distinguir as lipases das esterases (Bornscheuer, 2002). As esterases (E.C. 3.1.1.1), carboxil éster hidrolases, são enzimas que catalisam a hidrólise de ésteres e, por isso, são muitas vezes difíceis de serem diferenciadas das lipases. Entretanto, sua atuação está restrita à hidrólise de ligações éster em substratos solúveis em água. Atualmente, a definição mais aceita e utilizada para diferenciar lipases de esterases é que as primeiras são carboxilesterases que hidrolisam acilgliceróis de cadeia longa (cadeia acila com mais de 10 átomos de carbono), enquanto as esterases são capazes de realizar a hidrólise somente de acilgliceróis com menos de 10 átomos de carbono (Fojan *et al.*, 2000). Cabe ressaltar que a maioria das lipases é capaz de hidrolisar os substratos das esterases, enquanto o inverso não é verdadeiro.

O fenômeno de ativação interfacial ocorre quando a lipase entra em contato com uma interface hidrofóbica abrindo sua tampa polipeptídica, que consiste em uma reestruturação conformacional da lipase, expondo o sítio ativo e tornando a enzima ativa. A presença da chamada “tampa” das lipases, bem como a elucidação do fenômeno de ativação interfacial foi possível após a determinação da estrutura tridimensional das lipases de *Rhizomucor miehei* (Brady *et al.*, 1990), *Geotrichum candidum* (Schrag *et al.*, 1991) e da lipase pancreática humana (Winkler, Darcy e Hunziker, 1990). O movimento de abertura da tampa cria uma região eletrofílica próxima ao resíduo serina do sítio ativo, denominada cavidade do oxiânion, que é responsável pela estabilização das cargas negativas do intermediário tetraédrico do estado de transição formado durante a hidrólise do éster (Aloulou *et al.*, 2006).

A presença da tampa recobrindo o sítio ativo das lipases não estaria necessariamente correlacionada com o fenômeno de ativação interfacial conforme acreditou-se por muitos anos. Algumas cepas de *Pseudomonas aeruginosa*, *Burkholderia glumae* e *Candida antartica* possuem a tampa anfipática, mas não apresentam o fenômeno da ativação interfacial (Verger, 1997). Outras lipases são descritas como não contendo a tampa recobrindo o sítio ativo (Lotti e Alberghina, 2007). Outro interessante fato sobre as tampas presentes em algumas lipases é o seu papel nas características da enzima.

O sítio ativo das lipases é composto por uma tríade catalítica formada por serina, aspartato (ou glutamato) e histidina, semelhante à observada em serino-peptidases (Carrasco-Lopez *et al.*, 2009). Apesar da semelhança química entre as lipases e as serino-peptidases, elas apresentam diferenças estruturais que invertem a estereoquímica da tríade catalítica (Kapoor e Gupta, 2012). Todas as lipases conhecidas, tanto de eucariotos quanto procariotos, apesar de diferenças na

sequência de aminoácidos, possuem a estrutura tridimensional do tipo α/β hidrolase (Schrag e Cygler, 1997), a qual apresenta um núcleo composto por fitas β-paralelas rodeado por porções em α-hélice (Figura 9.10)



FIGURA 9.10 Representação estrutural de uma α/β hidrolase. *Fonte*: https:/commons.wikimedia.org/wiki/File:PDB_1jfr_EBI.jpg.

A hipótese mais aceita do mecanismo de ação das lipases sugere que a catálise por lipases ocorra de forma similar à catálise por serino-peptidases, devido à grande semelhança da sua tríade catalítica. Apesar de ser uma enzima bastante versátil e catalisar diferentes reações (Figuras 9.8 e 9.9), acredita-se que o mecanismo cinético das lipases não dependa do tipo de reação catalisada (Jaeger e Reetz, 1998). A reação inicia-se com o ataque nucleofílico ao carbono da ligação éster do lipídeo susceptível pelo átomo de oxigênio do grupo hidroxila do resíduo serina do sítio ativo, formando um complexo enzimático acilado e havendo a liberação de álcool do lipídeo. Posteriormente, ocorre a hidrólise do complexo enzimático acilado, regenerando a lipase e deixando-a pronta para uma nova reação.

9.5.2. Micro-organismos produtores de lipases

As lipases podem ser obtidas de diversas fontes, como animais (lipases pancreática e gástrica), plantas (lipases de sementes de canola, mamona, pinhão-manso, mostarda, dendê...) e micro-organismos (bactérias e fungos). Estas últimas são as mais estudadas no campo da biotecnologia devido, principalmente, a uma maior facilidade de produção em larga escala (Freire e Castilho, Sharma *et al.*, 2001).

Diversos são os micro-organismos produtores de lipase. Dentre os mais estudados, estão as bactérias dos gêneros *Bacillus*, *Pseudomonas* e *Burkholderia* e os

fungos dos gêneros *Penicillium*, *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Geotrichum* e *Yarrowia*, entre outros, os quais produzem essas enzimas ou por fermentação submersa (FS) ou por fermentação em estado sólido (FES).

Diversas lipases microbianas são industrialmente produzidas e comercializadas, como exemplificado na Tabela 9.4.

Tabela 9.4

Exemplos de lipases comerciais

Fonte	Micro-organismo produtor	Indústria produtora	Nome comercial
Fúngica	*Candida antarctica*	Novozymes	Novozym 435
	C. rugosa	Amano, Sigma	Amano AY
	Thermomyces lanuginosus	Novozymes	Lipolase
	Rhizomucor miehei	Novozymes	Palatase
	Aspergillus niger	Amano, Sigma	Amano Lipase A
Bacteriana	*Burkholderia cepacia*	Amano, Sigma	Amano Lipase PS
	Pseudomonas aeruginosa	Genencor	Lipomax
	B glumae	Biocatalysts	-
	P. fluorescens	Amano, Sigma	PFL

A demanda industrial por novas enzimas, com diferentes características catalíticas e de estabilidade, leva a comunidade científica a selecionar novas cepas microbianas produtoras de lipase a partir de diferentes fontes, como efluente da indústria de papel e celulose (Tripathi *et al.*, 2014), hibisco (Bussamara *et al.*, 2010), poços de petróleo (Kumar e Gupta, 2008), cerrado brasileiro (Colen *et al.*, 2006), fontes termais (Shariff *et al.*, 2007), dentre outros. Além disso, ferramentas como mutações sítio-dirigidas e evolução dirigida também vêm sendo utilizadas para a obtenção de lipases com propiedades específicas requeridas (Wang *et al.*, 2015; Wahab *et al.*, 2015; Madan e Mishra, 2014; Qin *et al.*, 2013).

A produção de lipases microbianas, como mencionado anteriormente, pode ocorrer pelo processo de fermentação submersa (FS) ou de fermentação em estado sólido (FES). A escolha do processo adequado irá depender tanto do requerimento nutricional e adaptação do micro-organismo ao meio de cultivo quanto da aplicação final da enzima. No caso, por exemplo da indústria farmacêutica, torna-se necessária a obtenção da lipase produzida purificada. Caso esta lipase fosse produzida por FES, o gasto com o processo de purificação seria inviável do ponto de vista econômico. Em contrapartida, em processos nos quais não é necessária uma pureza tão alta das enzimas produzidas e não há valor agregado do produto final, como produção de biocombustíveis ou tratamento de efluentes, a FES torna-se uma alternativa interessante para a obtenção de lipase a baixo custo, uma vez que podem ser empregados os mais diversos resíduos agroindustriais.

Diversos trabalhos têm focado na otimização da produção de lipases em FS e FES, alcançando bons resultados por meio da otimização do meio de cultivo ou das condições de crescimento do micro-organismo. Sathishkumar *et al.* (2015) utilizaram um planejamento sequencial de experimentos para a otimização do meio

de cultivo utilizado na produção de lipase por *Halobacillus trueperi* RSK CAS9 por FS. Após o processo de otimização, os autores conseguiram um aumento de 467.33 U/ml para 1410.17 U/ml. As condições de cultivo para a produção de lipase de *Penicillium simplicissimum* por FES, utilizando torta de mamona como matéria-prima, também foram estudadas por Godoy *et al.* (2011). Neste trabalho, os autores empregaram o Planejamento Placjkett-Burman (planejamento de seleção de variáveis), seguindo de um Delineamento Composto Central Rotacional, (DCCR), conseguindo um aumento de 340% da atividade lipásica.

9.5.3. Aplicações das lipases

Como já mencionado, as lipases podem catalisar não somente reações de hidrólise, como também reações de síntese como esterificação, alcoólise, aminólise, entre outras. Devido a essas diversas reações e à possibilidade de realizá-las em régio- ou enântioseletividade, as lipases são consideradas um dos grupos de enzimas mais versáteis, apresentando uma grande variedade de aplicações em processos industriais, sem geração de produtos tóxicos ou poluentes (Schmid *et al.*, 2002). Estudos em busca de novas lipases têm sido cada vez mais intensificados, por meio de tecnologias como recombinação gênica e engenharia de proteínas, as quais propiciaram a obtenção de enzimas com novas características (atividade, estabilidade a altas temperaturas e amplas faixas de pH, seletividade, especificidade) e mais dirigidas a substratos e condições de interesse industrial, promovendo a expansão da aplicação destas enzimas.

Aplicação na indústria alimentícia. Na indústria alimentícia, óleos e gorduras estão dentre os principais constituintes da dieta e devem ser, na maioria das vezes, modificados para torná-los mais saudáveis. Processamentos como hidrólise, esterificação, acidólise, intereseterificação e transesterificação de óleos e gorduras são amplamentes utilizados na indústria de alimentos. Estes processamentos podem ser realizados por via química, mas muitas vezes necessitam de altas temperaturas e pressão, com consequente geração de impurezas (Ray, 2012). As lipases surgem então como uma alternativa, por necessitarem de condições mais brandas de reação e serem, muitas vezes, específicas, gerando desta forma menos subprodutos de reação. Dentre essas conversões, esterificação e transesterificação por via enzimática são comumente utilizadas na indústria alimentícia para agregar valor a alguns produtos alimentícios (Gupta *et al.*, 2015).

As lipases têm sido utilizadas no desenvolvimento de aromas de queijos e derivados, achocolatados e bebidas alcoólicas, através da catálise da hidrólise seletiva de triacilgliceróis e liberação de ácidos graxos de cadeia curta, que atuam como flavorizantes ou como precursores destes (Divakar e Manohar, 2007). As lipases podem também ser utilizadas na hidrólise da gordura do leite, na obtenção de melhor textura de massas de pães, na maturação de salsichas ou ainda na remoção de gordura de produtos de carnes e peixes.

Diversas outras modificações são realizadas para aumentar o valor nutritivo de óleos e gorduras, tais como o enriquecimento de óleos com ácidos graxos

poliinsaturados e ácido oleico, síntese de lipídeos estruturados, substituintes de gordura de leite humano, dentre outros (Anobom *et al.*, 2014).

Aplicação na indústria de detergentes. A principal aplicação industrial das lipases é como aditivos em detergentes, sendo responsável pela venda de cerca de mil toneladas desta enzima por ano (Sharma *et al.*, 2001) Como aditivos na formulação de detergentes, são requeridas algumas características dessas enzimas, como uma baixa especificidade pelo substrato, não devendo diferenciá-lo e sim ter a capacidade de hidrolisar gorduras de diferentes composições. Além disso, elas devem ser estáveis nas condições de lavagem, tornando-se necessário que essas lipases sejam capazes de atuar em ambiente alcalino (pH 10-11) e em ampla faixa de temperatura (30-60°C). Muitos detergentes têm em suas formulações surfactantes e outras enzimas, como peptidases e alquil benzeno sulfonatos e proteases, devendo as lipases ser resistentes à ação dos peptidases (Freire e Castilho, 2008).

Aplicação na indústria de fármacos e química fina. A utilização de lipases nas indústrias química e farmacêutica também tem crescido consideravelmente. As características de régio, enântio e quimiosseletividade das lipases permitem a sua utilização na resolução de misturas racêmicas e remoção seletiva de certos compostos para a síntese de drogas quirais (Berglund e Hult, 2000). As lipases catalisam reações sobre substratos pró-quirais e propiciam a resolução cinética de misturas racêmicas, atuando sobre diferentes grupos funcionais, como álcoois e ésteres carboxílicos quirais ou pró-quirais, cianidrinas, cloridrinas, dióis, α e β-hidróxi ácidos, aminas, diaminas e amino-álcoois. Além disso, as lipases possuem, geralmente, uma grande estabilidade em solventes orgânicos (Jaeger e Eggert, 2002).

Aplicação na indústria de papel e celulose. Na indústria de papel e celulose, as lipases são utilizadas, desde meados da década de 90, para a remoção do *pitch*, que é um conjunto de componentes hidrofóbicos da madeira, como triacilgliceróis e ceras, que são indesejáveis na manufatura de papel (Jaeger e Reetz, 1998). O *pitch* fica depositado em diferentes peças das máquinas da fábrica de papel e celulose, gerando custos na manutenção de equipamentos e perdas financeiras. Inicialmente, utilizou-se lipase isolada de *Candida cylindraceae* e posteriormente a enzima comercial Resinase®, recombinante expressa em *Aspergillus oryzae* produzida pela Novozymes, chegou ao mercado. Um grande número de estudos nessa área vem sendo desenvolvido, fazendo surgir outras lipases para uso em indústria de papel, tais como Lipidase 10000, entre outras. A Resinase® hidrolisa aproximadamente 95% dos triacilgliceróis em polpa mecânica de pino (*Pinus densiflora*), além disso, o tratamento reduz o número de depósitos, o número de manchas e buracos no papel, permitindo redução no depósito de "pitch" (Hata *et al.*, 1996).

Aplicação na indústria de energia. Outra aplicação das lipases que tem gerado grande interesse atualmente é na produção de biodiesel e biolubrificantes. A produção do biodiesel consiste na transesterificação de óleos ou gorduras com álcoois de cadeias curtas, principalmente metanol e etanol, produzindo alquil ésteres de ácidos graxos (biodiesel) e glicerol em uma única etapa. Por via química, a catálise se dá por um ácido ou por uma base, não apresentando diferença

significativa entre eles quanto aos resultados da reação. Entretanto, essa reação pode ser também catalisada por enzimas. A utilização desses biocatalisadores apresenta algumas vantagens potenciais quando comparada às vias químicas tradicionais, como a facilidade de separação do biocatalisador (enzima imobilizada); a fácil recuperação do glicerol e a conversão dos ácidos livres presentes no óleo vegetal em biodiesel. Desta forma, apesar da via química de produção de biodiesel a partir de óleos vegetais encontrar-se bem estabelecida industrialmente, a utilização de uma via enzimática, catalisada especificamente por lipases, apresenta-se como uma excelente alternativa para redução dos impactos ambientais. A partir da transesterificação de óleos vegetais também é possível a produção de biolubrificantes (Shieh *et al.*, 2003). Entretanto, para viabilizar a utilização de lipases neste setor industrial, necessita-se da sua obtenção a custos reduzidos.

Aplicação em cosméticos. As formulações cosméticas têm por finalidade preservar a homeostase cutânea combatendo o estresse oxidativo, isto é, o desequilíbrio entre as nossas defesas antioxidantes e os radicais livres gerados na pele. Diversos trabalhos têm demonstrado que substâncias fenólicas possuem alto potencial antioxidante contra estas espécies químicas. Para melhorar a solubilidade destas substâncias em produtos cosméticos, derivados de ácidos fenólicos podem ser produzidos por meio da aplicação de lipases como biocatalisadores. Alguns autores citam o potencial biocatalisador de lipases B de *Candida antarctica* (CALB) exibindo ótimo rendimento. Esta lipase pode ser aplicada em diferentes classes de ativos, como, por exemplo: (i) moléculas análogas às ceramidas da pele produzidas biotecnologicamente isentas de solventes orgânicos; (ii) moléculas derivadas do ácido salicílico com atividade antioxidante e antiacne; e (iii) os retinoides derivados da vitamina A. As empresas multinacionais de cosméticos têm investido na acilação de produtos fotoprotetores, antioxidantes, emolientes e rejuvenescedores por meio da ação de lipases como biocatalisadores. Elas afirmam a qualidade superior aos produtos catalisados quimicamente e com mínima purificação, além da produção com altos índices de rendimento com o menor impacto ao meio ambiente (Mouad e Porto, 2014).

As lipases atuam sobre os lipídeos hidrolisando os núcleos sebáceos dos cravos, e sobre os óleos reduzindo o brilho da pele (Braz e Sakuma, 2012). Dentre certas vantagens na utilização das lipases, pode-se citar a elevada especificidade; a diminuição de riscos para a saúde, quando utilizadas na indústria alimentar; os baixos níveis de ocorrência de reações laterais e as condições reacionais brandas, que permitem um menor consumo energético e evitam a degradação ou decomposição de produtos e reagentes. Uma das mais importantes razões para o grande número de aplicações das lipases está no fato de elas exibirem régio, substrato e estereoespecificidade (Braz e Sakuma, 2012; Kapoor e Gupta, 2012).

9.6. Holocelulases

As holocelulases são um complexo de enzimas capazes de hidrolisar a fração polissacarídica da biomassa vegetal, incluindo as frações de celulose, hemicelulose e pectina. As enzimas celulases (endoglucanases, celobiohidrolases e β-glucosidases), hemicelulases (endoxilanases e β-xilosidases) e pectinases fazem parte desse complexo enzimático.

A biomassa vegetal é constituída por uma fração polissacarídica, que engloba a celulose, hemicelulose e pectina e o componente fenólico da lignina, presentes na parede celular do vegetal. Sendo o principal componente do suporte estrutural, a parede celular vegetal é construída para resistir à degradação microbiana (Goyal *et al.*, 2008).

As celulases são um sistema multicomponente composto por 3 enzimas: endoglucanases (EC 3.2.1.74), celobiohidrolases (EC 3.2.1.91) e β-glicosidases (CE 3.2.1.21). As endoglucanases (EG), ou 1,4- β-D-glucana-glucanohidrolases, são caracterizadas pela sua capacidade em clivar randomicamente a fração amorfa da celulose, produzindo uma mudança rápida no grau de polimerização da molécula. A taxa de hidrólise de cadeias longas de celooligossacarídeos é alta, e esta taxa aumenta com o grau de polimerização. A glucose e a celobiose são os produtos finais da reação (Grigorevski-Lima *et al.*, 2013; Kaur *et al.*, 2014). As exoglucanases, também chamadas celobiohidrolases (CBH) ou 1,4-β-D-glucana-celobiohidrolase, são definidas por sua capacidade de liberar unidades de celobiose a partir dos terminais redutor e não redutor da cadeia de celulose. As β-D-glucosidases completam a hidrólise até glucose, a partir de pequenas cadeias de celooligossacarídeos e celobiose, as quais são liberadas por outras enzimas. A hidrólise completa da celulose é o resultado combinado da ação sinergística destas três enzimas (Bon, Girio e Pereira Jr., 2008). Na Figura 9.11 podemos observar os mecanismos de ação das celulases.

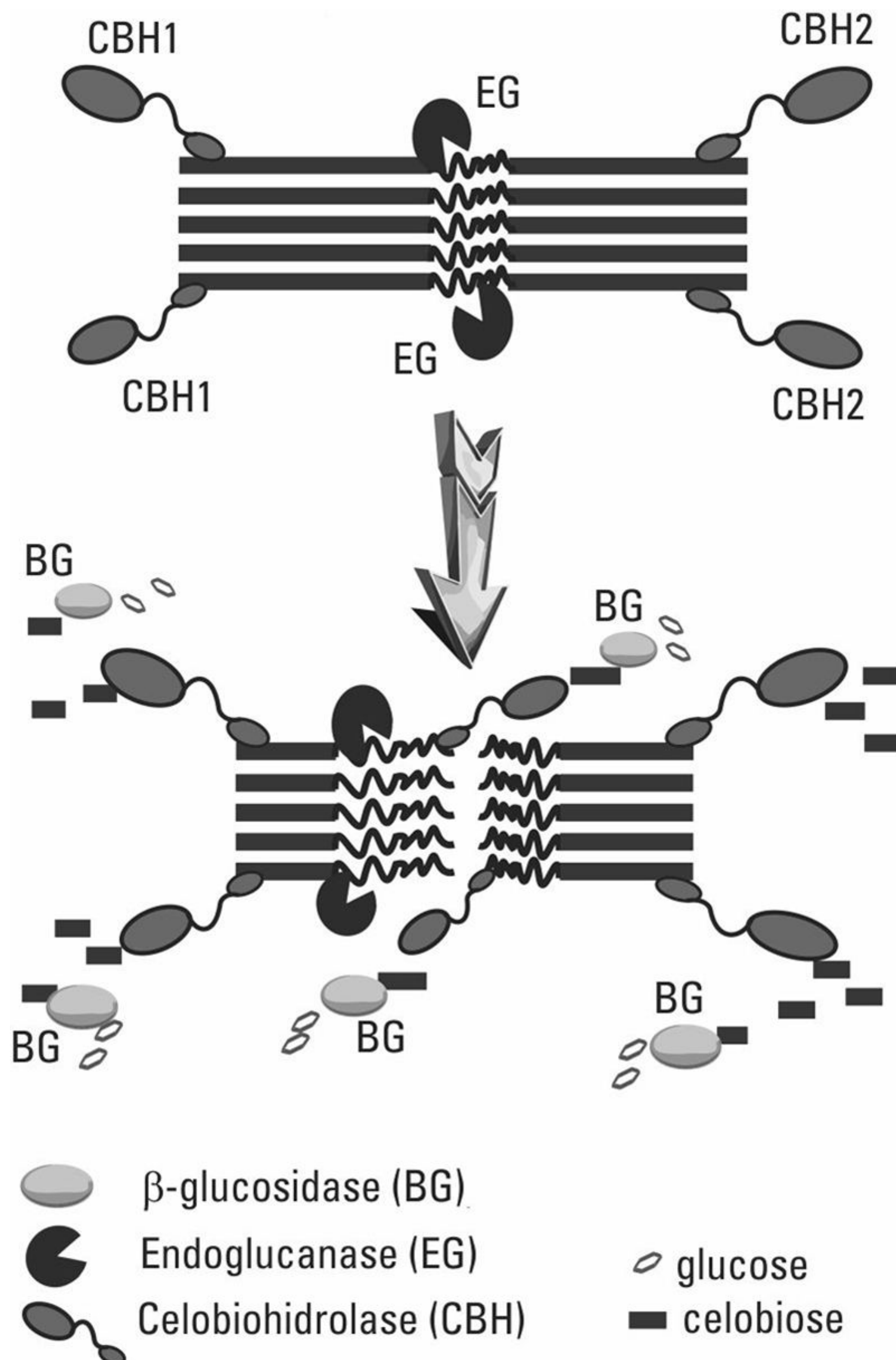


FIGURA 9.11 **Mecanismo de ação das celulases sobre o substrato celulose.**

As hemicelulases são um complexo de enzimas que envolvem diferentes mecanismos catalíticos, sendo o principal, aquele que cliva as ligações β-1,4 do esqueleto principal da xilana, realizado pelas β-1,4-endoxilanases (E.C. 3.2.1.8). Outra enzima responsável pela clivagem dos pequenos xilo-oligossacarídeos

gerados pela hidrólise da cadeia principal em xilose é a β-1,4-xilosidases (E.C. 3.2.1.37). Contudo, como a hemicelulose é um heteropolissacarídeo ramificado, as diferentes cadeias laterais são clivadas pelas enzimas α-L-arabinofuranosidases (E.C. 3.2.1.55), α-D- -metil-glucuronidases (E.C. 3.2.1.139), acetil xilana esterases (E.C. 3.1.1.72) e feruloil esterases (E.C. 3.1.1.73). Todas essas enzimas agem sinergisticamente, de modo a converter a xilana em seus açúcares constituintes (xilose, arabinose, acetil). A principal enzima do complexo é a β-1,4-endoxilanase (β-1,4-D-xilan-xilanohidrolase) que reduz o grau de polimerização da xilana de forma randômica para então as β-xilosidases (β-1,4-D-xilosídeo-xilohidrolase) gerarem monômeros de xilose a partir dos terminais não redutores de xilo-oligossacarídeos até 4 unidades de xilose (Nascimento *et al.*, 2002; Bon, Girio e Pereira Jr., 2008). As outras enzimas atuam na clivagem de ligações adjacentes nas cadeias laterais da xilana e o mecanismo de ação do complexo das hemicelulases está descrito na Figura 9.12.

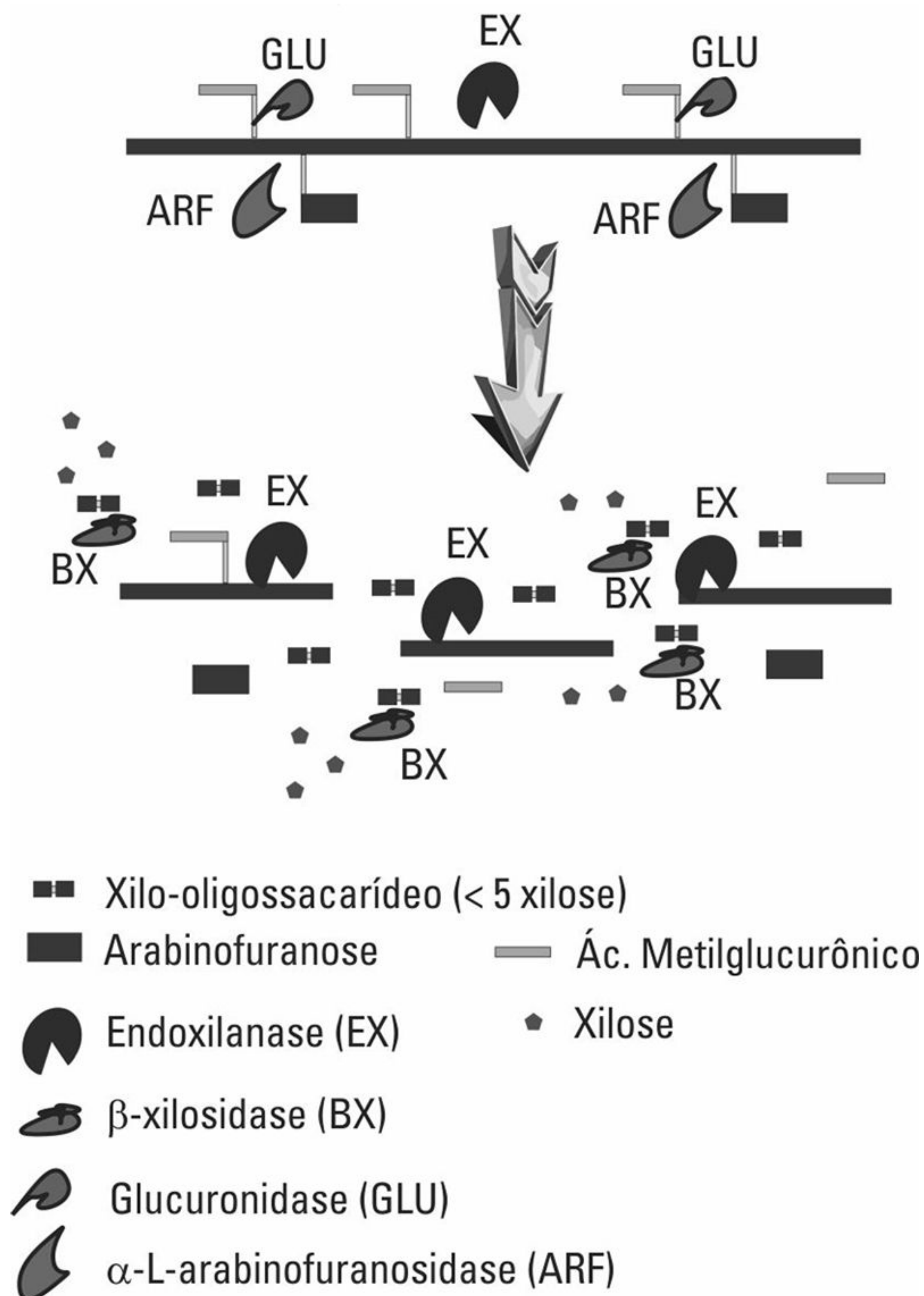


FIGURA 9.12 **Mecanismo de ação das hemicelulases sobre a estrutura da xilana.**

9.6.1. Micro-organismos produtores de holocelulases

A biodegradação de materiais celulósicos constitui uma das partes mais importantes no ciclo biogeoquímico do carbono, e o entendimento do

funcionamento deste processo bioquímico representa uma grande contribuição para as ciências naturais. Muitos micro-organismos, em especial fungos e actinobactérias, são capazes de degradar os diferentes componentes da biomassa vegetal. Contudo, até o presente momento ainda não foi isolado da natureza um micro-organismo capaz de degradar todos os componentes da biomassa vegetal, sendo necessário um consórcio microbiano para se atingir a total hidrólise da massa lignocelulósica, convertendo-a em CO_2, água, energia e biomassa. As principais enzimas responsáveis pela degradação dos componentes lignocelulósicos fazem parte do complexo das holocelulases (celulases, hemicelulases e pectinases), as oxidases (Lignina peroxidase, Lacase, Manganes peroxidase).

A produção de celulases pode ser conduzida em sistemas de reatores simples (erlenmeyers) ou reatores automatizados, utilizando meios de cultura quimicamente definidos, suplementados com fontes celulósicas industrializadas (celulose microcristalina, carboximetilcelulose) ou em meios quimicamente complexos suplementados com rejeitos agroindustriais (bagaço e palha de cana, farelo e palha de trigo, palha e sabugo de milho, etc.). As adaptações vão depender do grupo microbiano com o qual se vai trabalhar. Fungos filamentosos têm exigências metabólicas diferenciadas das bactérias, quanto ao pH de crescimento e à presença de oxigênio, além da suplementação de sais minerais como elementos traços.

As actinobactérias, procariotos filamentosos Gram-positivos, são capazes de produzir uma gama de enzimas hidrolíticas capazes de degradar compostos nitrogenados orgânicos, carboidratos, vários esteroides como colesterol, uma variedade de compostos aromáticos, acetileno e muitos outros. Dentre essas enzimas, destacamos as holocelulases. Muitas espécies de actinobactérias, principalmente do gênero *Streptomyces* sp., são apresentadas na literatura como grandes produtoras de celulases e xilanases (Nascimento *et al.*, 2002; Da Vinha *et al.*, 2011; Macedo *et al.*, 2013; Franco-Cirigliano *et al.*, 2013). Macedo e colaboradores (2013) estudaram o efeito da composição do meio de cultivo na produção de celulases (endoglucanases) pela linhagem *Streptomyces* sp. SLBA-08, isolado de solo da caatinga brasileira, variando concentrações de palha de cana-de-açúcar e milhocina (Figura 9.13). Foi possível observar que quando se aumentou a concentração de palha no meio de cultivo de 0,8% (p/v) para 2,4% (p/v) houve um aumento de mais de 500% na produção de endoglucanase, nas mesmas condições de fermentação.

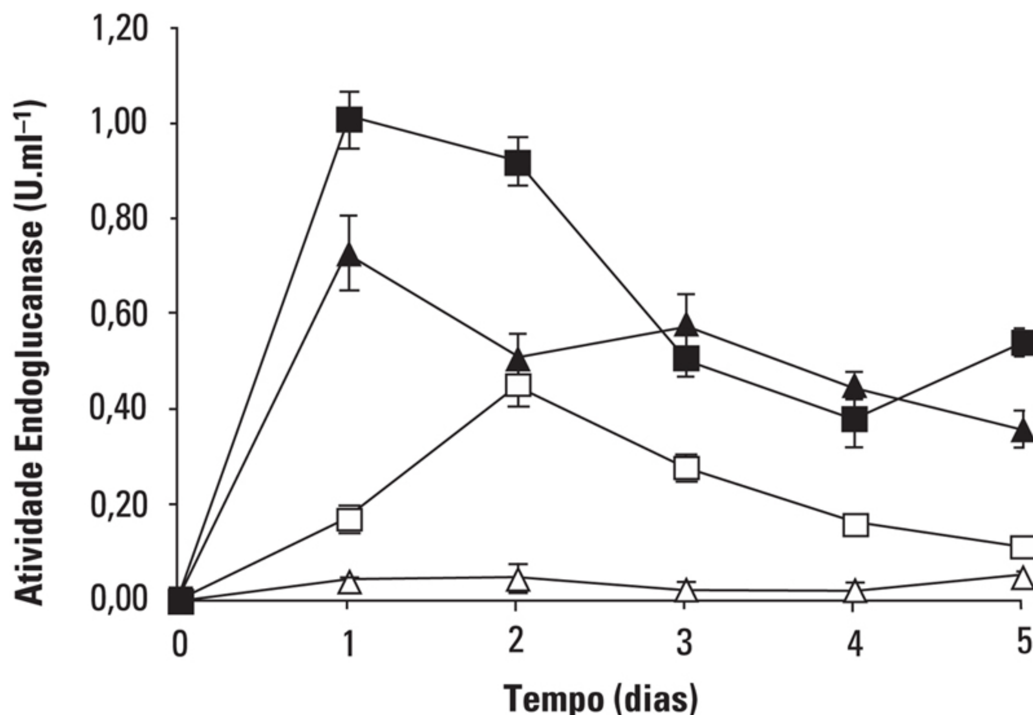


FIGURA 9.13 Cinética de produção de celulases (endoglucanases) por *Streptomyces* sp. SLBA-08 em fermentação submersa, crescido em meio de sais (KH_2PO_4, 6.0; K_2HPO_4, 3.0; $MgSO_4.7H_2O$, 0.2; $CaCl_2$, 0.05; $MnSO_4.7H_2O$, 0.01; $ZnSO_4.7H_2O$, 0.001) suplementado com 0,8% (p/v) palha de cana-de-açúcar e 0,3% (p/v) milhocina (□); 2,4% (p/v) palha de cana-de-açúcar e 0,3% (p/v) milhocina (▪); 0,8% (p/v) palha de cana-de-açúcar e 1,3% (p/v) milhocina (▵); 2,4% (p/v) palha de cana-de-açúcar e 1,3% (p/v) milhocina (▴) a 30ºC / 5 dias / 200 rpm. *Fonte*: Macedo *et al.* (2013).

Nascimento *et al.* (2002) estudaram o efeito de diferentes fontes de carbono na produção de xilanases pela linhagem *Streptomyces malaysiensis* AMT-3, isolada de solo de cerrado brasileiro. Foi possível verificar que mesmo utilizando diferentes tipos de xilana, houve diferentes respostas na produção da enzima, sendo as xilanas de conífera (*larchwood*) e de aveia (*oat spelts*) as melhores fontes, após 10 dias de fermentação submersa a 30°C / 200 rpm em meio de sais minerais sem fonte orgânica de nitrogênio. Estes dados apontam que diferentes matérias-primas (gérmen de trigo, sabugo de milho, farelo de trigo, xilanas, etc.) podem influenciar de forma diferenciada a produção das endoxilanases, reforçando a importância de uma escolha adequada do substrato para obter uma melhor resposta da produção de enzimas (Figura 9.14).

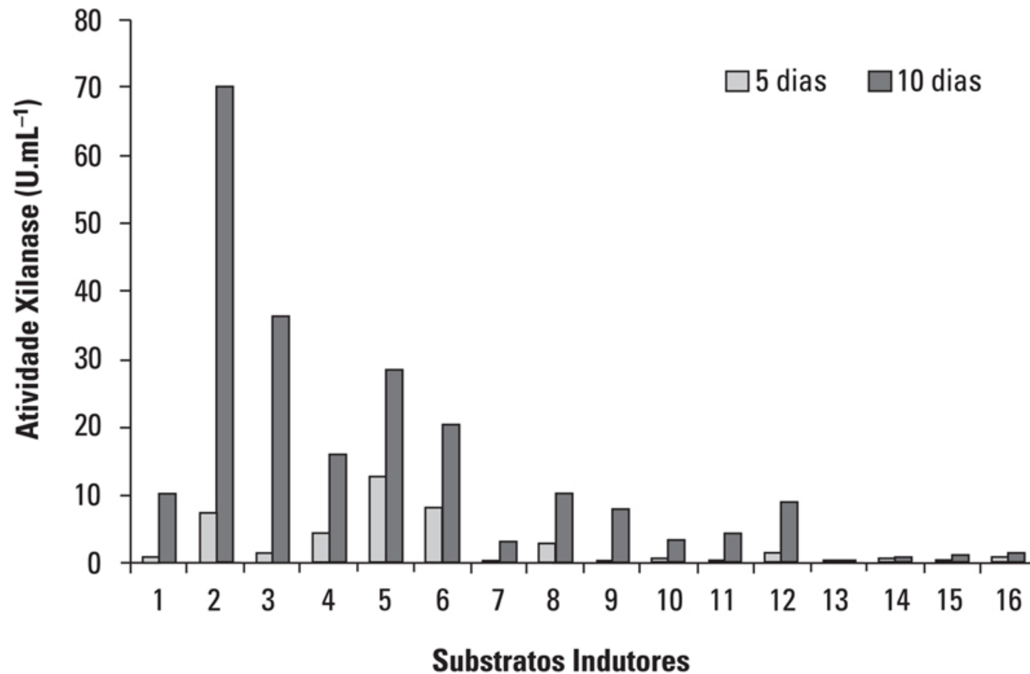


FIGURA 9.14 Produção de xilanases pela linhagem *Streptomyces malaysiensis* AMT-3, por fermentação submersa utilizando diferentes fontes de carbono: (1) xilana de bétula; (2) xilana de conífera; (3) xilana de aveia; (4) casca de malte cervejeiro; (5) farelo de trigo; (6) gérmen de trigo; (7) xilose; (8) resíduo "ARD"; (9) lama celulósica de reciclagem de papel; (10) xarope de milho; (11) xarope de milho diluído 10x; (12) sabugo de milho; (13) lascas de eucalipto; (14) glucose; (15) amido solúvel; (16) carboximetilcelulose. *Fonte*: Nascimento *et al.* (2002).

Os fungos são micro-organismos eucariotos mais bem distribuídos no ambiente e com grande versatilidade metabólica, sendo considerados os principais organismos decompositores no meio ambiente, em especial do material lignocelulósico. Dentre os fungos lignocelulolíticos, destacamos os gêneros, *Trichoderma*, *Penicillium*, *Aspergillus* e *Acremonium*. Existem vários trabalhos na literatura que apontam diferentes estratégias de produção de holocelulases por fungos filamentosos (Grigorevski-Lima *et al.*, 2009; Andrade *et al.*, 2011; Souza *et al.*, 2012; Grigorevski-Lima *et al.*, 2013; Oliveira *et al.*, 2014). Andrade e colaboradores utilizaram a ferramenta estatística planejamento fatorial para otimizar a produção de celulases pelo fungo *Trichoderma* sp. IS-05, isolado de sedimento arenoso de restinga. Como matéria-prima lignocelulósica foi utilizada farelo de trigo. A maior produção de atividade de celulase foi detectada quando se utilizou 4,4% (p/v) de farelo de trigo e 0,25% (p/v) de peptona de carne, atingindo valores de 1.224,0 U/mL em 2 dias de fermentação (Figura 9.15).

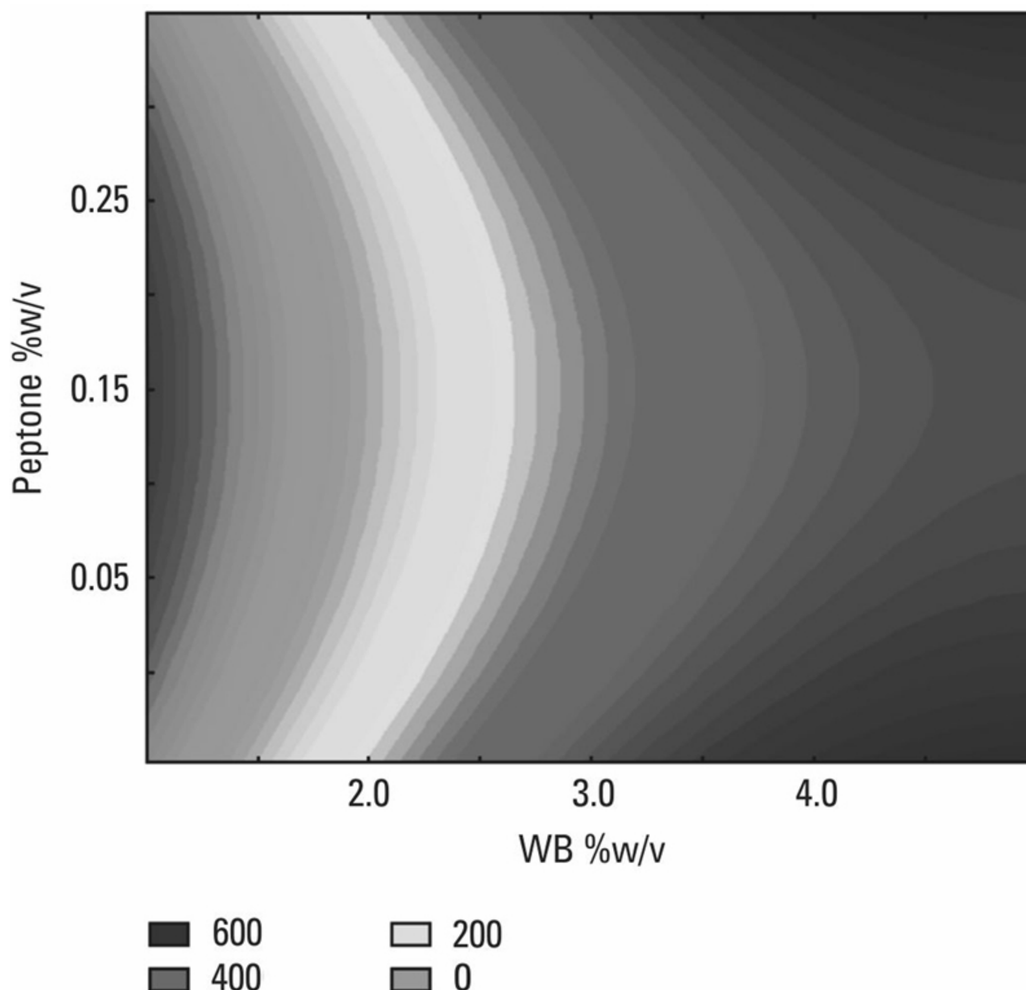


FIGURA 9.15 **Superfície de contorno da produção de celulases pelo fungo *Trichoderma* sp. IS-05 utilizando farelo de trigo (WB) e peptona de carne (peptone) por fermentação submersa, ao fim de 2 dias.** *Fonte*: Andrade *et al.* (2011).

Grigorevski-Lima *et al.* (2013) observaram a produção de holocelulases pelo fungo *Trichoderma atroviride* 676 da coleção de culturas da Fiocruz-AM por fermentação submersa utilizando como matérias-primas bagaço de cana *in natura,* bagaço de cana pré-tratado com explosão a vapor e farelo de trigo. Observou-se que a maior produção tanto de endoglucanase (celulase) como endoxilanase foi observada quando se utilizou o bagaço de cana *in natura* como fonte de carbono ao fim de 4 dias de fermentação (Figuras 9.16 e 9.17).

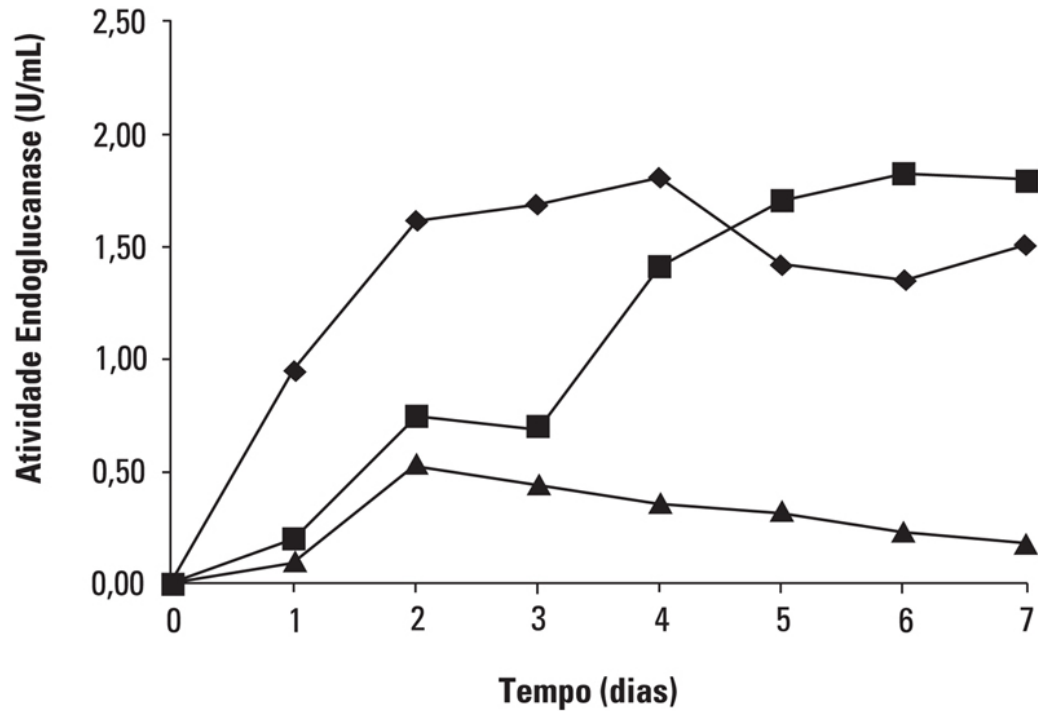


FIGURA 9.16 Produção de endoglucanases pelo fungo *Trichoderma atroviride* 676 utilizando bagaço de cana *in natura* (♦), bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (▪) e farelo de trigo (▲) por fermentação submersa. *Fonte*: Grigorevski *et al.* (2013).

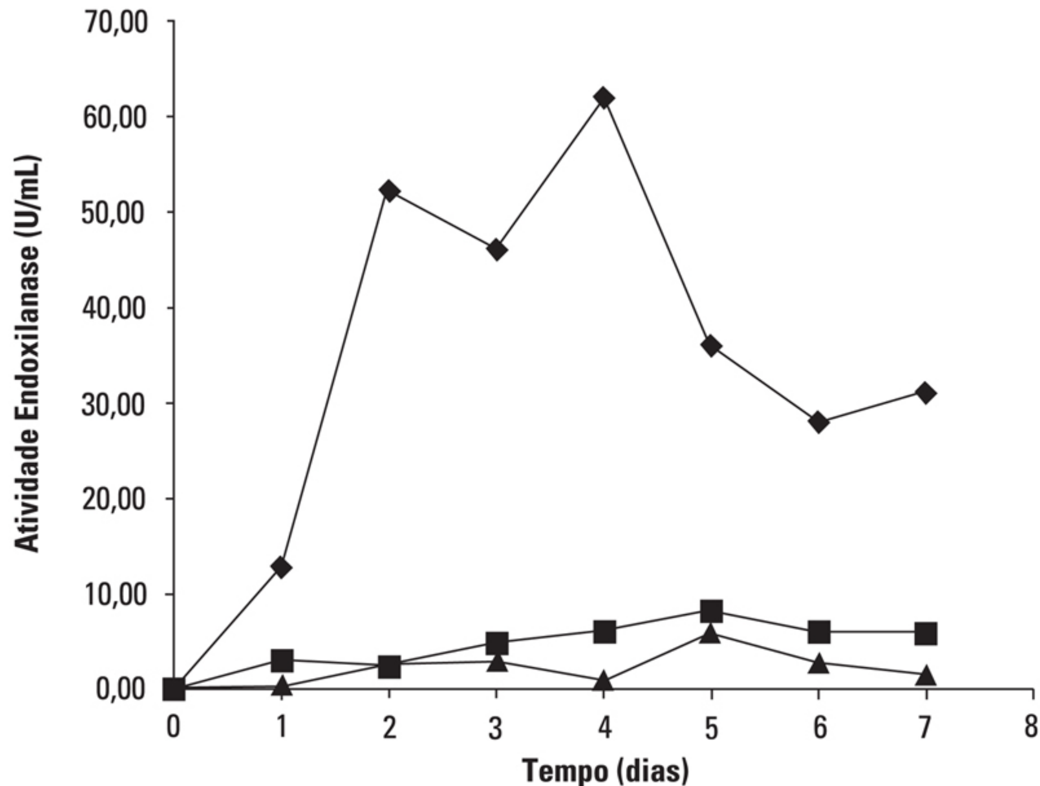


FIGURA 9.17 Produção de endoxilanases pelo fungo *Trichoderma atroviride* 676 utilizando bagaço de cana *in natura* (♦), bagaço de cana pré-tratado por explosão a vapor (▪) e farelo de trigo (▴) por fermentação submersa. *Fonte*: Grigorevski *et al.* (2013).

9.6.2. Aplicações das holocelulases

As holocelulases já vêm sendo estudadas desde a década de 1980, onde primeiramente se realizaram estudos promissores utilizando rações animais e depois expandindo para a área alimentícia, bioenergética, têxtil, detergentes (Bon *et al.*, 2008; Golan, 2011). Atualmente, a principal aplicação das celulases está voltada para a produção de etanol celulósico (bioenergética), que será abordado de forma aprofundada no Capítulo 10. Atualmente, as holocelulases contabilizam uma fatia superior a 20% do mercado mundial de enzimas, sendo a maioria produzida por *Aspergillus* e *Trichoderma*.

Tanto as celulases como as xilanases comerciais geralmente são produzidas principalmente por fungos. As xilanases são oriundas de T*richoderma reesei, Thermomyces lanuginosus* (Cellic Ctec3 – *Novozymes*; Pentopan Mono BG® - *Sigma Aldrich*), enquanto que as celulases são oriundas de *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Penicillium* (Celluclast e Cellic CTec3 – *Novozymes*, Carezyme – *Sigma Aldrich*).

Reaproveitamento de resíduos (biorrefinaria). A utilização de resíduos lignocelulósicos, produzidos a partir do processamento da biomassa vegetal, como matéria-prima para a produção de enzimas vem sendo amplamente explorado, sendo uma das possibilidades de minimizar os custos do processo de produção de

enzimas, visto ser a matéria-prima uma das maiores responsáveis pelo impacto no custo final do produto. Primeiramente, os resíduos devem ser pré-tratados físico-quimicamente, objetivando facilitar a disponibilidade das fibras para a ação das enzimas. Uma vez que a parede celular tenha sido desconstruída, as enzimas holocelulolíticas (celulases e xilanases) hidrolizam a fração polissacarídica gerando açúcares que podem ser aplicados como blocos de construção (glucose, xilose) para a geração de uma série de produtos dentro do conceito de biorrefinaria (Bon, Girio e Pereira-Jr., 2008).

Indústria têxtil. O uso de holocelulases tem se tornado cada vez mais relevante, em especial na indústria têxtil. No início dos anos 90 a desengomagem enzimática era um dos principais focos das atenções com relação ao emprego da biotecnologia na indústria têxtil. Hoje em dia, já existe uma grande variedade de aplicações enzimáticas nesse ramo industrial. A principal vantagem do seu uso é a sua capacidade de modificar as fibras celulósicas de forma controlada, resultando em um produto de melhor qualidade. Assim sendo, as celulases objetivam a limpeza de superfície do material e a redução das pilosidades formadas na fibra de algodão; melhoramento das características de toque (maciez), gerando uma melhor ótica da superfície (Cavaco-Paulo, 1998). Uma das principais aplicações das celulases é no processo de bioestonagem, quando as celulases substituem as pedras pomes no estonamento das fibras de algodão tingidas com o corante índigo blue, apresentando um aspecto desbotado mais uniforme e uma menor resistência à flexão (Castro *et al.*, 2010). Outra aplicação é no processo de biopolimento, no qual o uso das celulases ajuda na eliminação de microfibrilas superficiais, criando uma superfície mais lisa, aumentando o brilho dos tecidos, evitando a formação de peloteamento (Andreaus e Cavaco-Paulo, 2008).

Indústria de detergentes. As celulases têm grande relevância na indústria de detergente em pó, proporcionando maior limpeza e menor degradação dos tecidos contendo fibra de algodão. Uma das ações mais observadas é o biopolimento, na remoção de fibras superficiais irregulares, deixando o tecido com aspecto de novo (Grigorevski-Lima *et al.*, 2005).

Indústria de papel e celulose. As holocelulases podem atuar na etapa de polpação bio-mecânica e na modificação das propriedades da fibra celulósica. Celulases e hemicelulases purificadas também são utilizadas na hidrólise parcial ou completa das fibras da polpa, sendo o processo de biobranqueamento da polpa uma das principais aplicações. As xilanases quebram as ligações entre as hemiceluloses e a celulose, aumentando a brancura e a alvura da polpa celulósica, gerando um papel mais branco e de melhor qualidade (Bhat, 2000; Nair *et al.*, 2010; Nagar *et al.*, 2013).

Indústria alimentícia. As holocelulases (celulases, pectinases e xilanases) têm uma variedade enorme de possíveis aplicações na indústria de alimentos, como na extração e clarificação de sucos de frutas e na extração de óleo de oliva. Essas enzimas atuam na hidrólise de pectina solúvel e componentes da parede celular, diminuindo a viscosidade e mantendo a textura dos sucos. As indústrias de vinho e cerveja também podem utilizar as holocelulases para a extração de pigmentos e substâncias aromatizantes presentes na casca da uva, clareamento dos produtos e melhoramento no processo de filtração (Bhat, 2000). Na fabricação de pães, as

xilanases também têm sido utilizadas para diminuir a viscosidade de massa, aumentando assim o seu volume e a vida útil (Chantasingh *et al.*, 2006). Além disso, a adição de endoxilanases na massa do pão pode favorecer o aumento da concentração de arabino xilo-oligossacarídeos, que tem efeitos benéficos à saúde do homem (Bhat, 2000). Já na fabricação de ração animal, as holocelulases são importantes para o tratamento enzimático de silagem. A utilização dessas enzimas na produção de ração para ruminantes e monogástricos apresentou resultados satisfatórios, como o aumento na digestibilidade da matéria seca e a melhora na viscosidade intestinal (Bhat, 2000; Fagundes *et al.*, 2008).

9.7. Estratégias para produção de enzimas

Vários metabólitos secundários com potencial aplicação industrial têm sido descritos na literatura, detectados em bactérias, fungos e leveduras. As enzimas são ferramentas importantes para a produção e diversificação destes metabólitos. Entre estas enzimas, encontram-se aquelas responsáveis pelo esqueleto carbônico da molécula e aquelas que realizam modificações deste esqueleto, como C- e O-metilações e oxidações. Como estas enzimas são produzidas naturalmente em pequenas quantidades, para produção em maior escala, muitas vezes faz-se necessária uma expressão heteróloga do gene ou complexo de genes. Os sistemas heterólogos usam frequentemente estirpes da bactéria *Escherichia coli* ou da levedura *Saccharomyces cerevisae,* para as quais muitas tecnologias de expressão gênica e de crescimento em escala industrial já foram desenvolvidas (Watanabe, 2014).

A produção enzimática pode também ser melhorada geneticamente, utilizando técnicas de biologia molecular, como descrito no Capítulo 6. As modificações genéticas (mutagêneses) podem ser realizadas diretamente na estrutura proteica (gene estrutural), ou indiretamente, afetando a via de síntese da enzima.

Um exemplo de manipulação que modifica a via regulatória de síntese foi realizado no fungo *Penicilium oxalicum*. Na estirpe selvagem, a expressão de celulase é regulada com base no equilíbrio entre a presença de celobiose e de glucose. No mutante, há um bloqueio da produção de glucose a partir de celobiose. Em consequência, a produção de celulase é ampliada por desrepressão (Yao *et al.*, 2015). Outro resultado interessante utilizando o mesmo tipo de estratégia foi obtido em relação à produção de feniletanol, um importante produto aromático usado na indústria de cosméticos, pela modificação de genes que participam da via de Erlich. O mutante que reunia os genes *aro8* e *aro10* (transaminase e descarboxilase) apresentou maior aumento na produção do composto em *Saccharomyces cerevisiae* (Yin *et al.*, 2015).

Um esquema geral do estudo e modificação genética de enzimas é apresentado na Figura 9.18.



FIGURA 9.18 **Linhas de experimentação até a utlilização de uma enzima a nível industrial.**

9.7.1. Peptídeo sintetases não ribossômicas

Peptídios não ribossômicos são pequenos peptídios sintetizados por fungos e bactérias, que apresentam grande importância biotecnológica, pois apresentam propriedades antibióticas, antivirais, anti-inflamatórias, imunossupressoras e surfactantes. Em geral, há necessidade de modificação destes peptídios para contornar problemas de resistência ou aumentar as propriedades terapêuticas. Elas agem de forma coordenada e semiautônoma, de forma a adicionar monômeros específicos a uma cadeia peptídica em formação, sem a interferência dos ribossomos. As enzimas responsáveis por esta síntese são remodeladas por engenharia genética (modelagem molecular) para gerar um produto modificado. Desta forma, podem ser gerados novos peptídeos bioativos (Calcott e Ackerley, 2014).

9.7.2. Expressão heteróloga de enzimas

O primeiro relato de expressão heteróloga de enzimas data de 1876, quando a quimosina bovina (enzima usada na produção de queijos) foi clonada e expressa

em *Escherichia coli* K12 (Olempska-Beer *et al.*, 2006).

Vários fatores devem ser considerados quando desejamos realizar uma expressão heteróloga de uma enzima. Um dos mais importantes é a escolha da bactéria hospedeira. Ela deve ser considerada inócua, segura, ter um eficiente sistema de secreção, deve ter um sistema de transcrição, tradução e secreção compatível com o gene (ou genes) da enzima a ser clonada (Bien *et al.*, 2014). Não produzir substância igual ou similar à codificada pelo gene a ser clonado. Caso produza, o respectivo gene deverá ser inativado. Podemos citar como exemplo a expressão heteróloga do conjunto enzimático com atividade celulásica.

Celulose é o principal componente estrutural da parede celular de vegetais, sendo o principal polímero de carboidrato encontrado na natureza. Porém, a sua quebra em carboidratos menores é restrita àqueles micro-organismos capazes de expressar enzimas de três categorias: endoglucanase (1,4-β-D-glucana glucano-hidrolase), exoglucanase (1,4-β-D-glucana celobiohidrolase) e celobiase ou β-glucosidase (Ryu e Mandels, 1980), que devem atuar sinergisticamente para obtermos a digestão completa até monômeros de glucose. Tentativas de expressar estas enzimas em *Escherichia coli* não foram muito bem-sucedidas, uma vez que as enzimas não eram secretadas, acumulando-se no citoplasma e gerando corpos de inclusão (Maki *et al.*, 2009; Makrides, 1996). Recentemente, estas enzimas foram expressas em *Bacillus subtilis*, que além de ser uma espécie bacteriana considerada segura, possui um aparato adequado para a secreção destas enzimas por meio de clonagem dos respectivos genes de *Clostridium thermocellum* (Bien *et al.*, 2014). As celulases produzidas por esta espécie mostraram uma alta taxa de sacarificação de lignocelulose (Zhang e Lynd, 2005), alta especificidade e maior termoestabilidade, quando comparadas àquelas produzidas por alguns fungos, como os do gênero *Thrycoderma* (Johnson *et al.*, 1982; Ngt e Zeikus, 1981).

Produção de metabólitos em larga escala. O aumento da produção de enzimas é uma estratégia interessante na produção industrial. Este objetivo pode ser atingido por meio de mutagênese. Mutantes de *Aspergillus oryzae* com um considerável aumento na produção de celulase foram obtidos por meio de mutagênese com luz ultravioleta (El-Ghonemy *et al.*, 2014). Outra estratégia bem-sucedida foi introduzir um promotor regulável no sistema de expressão de celulases em *Thrycodermareesei* (Xinxing, 2015).

Bloqueio de genes (knock out) e efeito na atividade metabólica/enzimática. Experimentos realizados por Gu *et al.* (2013) mostraram que o bloqueio de genes de permeases de L-triptofano em *E. coli*, representados pelos genes *Mtr*, *TnaB*, and *AroP* resultaram num aumento da síntese de L-triptofano. O triptofano é utilizado comercialmente como suplemento alimentar.

Modificação do sítio catalítico por engenharia genética. A estrutura tridimensional do domínio catalítico da celulase TrCel7A forma uma espécie de túnel, contendo três resíduos de triptofano que têm papel importante no processo de entrada da molécula de celulose no sítio catalítico e um destes aminoácidos é importante no processo de degradação da molécula cristalina. Mutações que introduziram glicosilação do sítio resultaram em aumento da atividade celulósica (Bommarius *et al.*, 2014).

Exemplo de fixação

Uso de enzimas em biossensores

Os biosensores consistem de biomoléculas, acopladas a eletrodos que permitem realizar a detecção e registro de moléculas e micro-organismos (Campàs et al., 2009). Entre estas biomoléculas, encontram-se as enzimas. Enzimas que mostrem estabilidade no sistema podem compor biossensores eficientes para detecção de analitos que sejam os substratos destas enzimas. Exemplos de enzimas que podem ser utilizadas em biosensores são as acetilcolinesterases modificadas (AChEs): utlilizadas na detecção de pesticidas (como organofosfato) e inseticidas contendo carbamato. Mutações resultando em troca de um aminoácido e aumentando a estabilidade da ligação com o suporte geraram maior eficiência na detecção do analito (Campàs et al., 2009).

A enzima é ligada a um filme ou membrana, a qual é aplicada sobre o eletrodo. Enzimas com potencial redox têm sido eficientemente utilizadas em biossensores. A glucose oxidase de *Aspergillus niger*, por exemplo, que recebeu por modificação genética uma polilisina na porção C-terminal e foi expressa em *Picchia pastoris* mostrou-se um sensor de glucose eficiente (Chen et al., 2002)

9.7.3. Adaptações genéticas

Enzimas adaptadas a baixas temperaturas. As enzimas presentes em micro-organismos psicrófilos apresentam maior flexibilidade em sua estrutura. Esta flexibilidade compensa a baixa cinética de reação normalmente observada. Elas apresentam uma entalpia ($\Delta H^{\#}$) de ativação reduzida e uma entropia ($\Delta S^{\#}$) de ativação mais negativa, quando comparadas às enzimas dos micro-organismos termófilos e mesófilos (Cavicchioli *et al.*, 2011). Isto faz com que as enzimas de psicrófilos tenham uma menor redução da reação em temperaturas baixas. As características estruturais que tornam estas enzimas mais flexíveis e ativas a baixas temperaturas são opostas às de termofílicos e mesofílicos: baixa hidrofobicidade central, aumento da hidrofobicidade de superfície, baixo índice de arginina/lisina, baixas interações intra e interunidades. Existência de mais alças maiores e com baixos índices de prolina. Entre as enzimas flexíveis adaptadas ao frio, encontramos a α-amilase de *Pseudoalteromonas haloplanktis* (Cavicchioli *et al.*, 2011). Estas informações podem ser usadas para modificar geneticamente os genes estruturais destas enzimas, tendo como resultado a remodelagem de enzimas para aumento de sua eficiência.

A fosfatase alcalina de bactérias antárticas são completamente inativadas a temperaturas de 50-55ºC, após um curto período de aquecimento. Para aumentar a produção desta enzima, a estratégia é reduzir a inibição competitiva pelo substrato (Cavicchioli *et al.*, 2011).

Enzimas adaptadas a altas temperaturas. Podemos denominar de bioprocessamento a combinação de tipos diferentes enzimáticos, incluindo enzimas modificadas geneticamente, que conjuntamente produzem açúcares a partir de celulose.

A maioria das fermentações ocorre na faixa de 28°C a 37°C, enquanto as enzimas celulolíticas apresentam melhor atividade em temperaturas na faixa dos 50°C (Ashforth, 2011).

Bactérias pertencentes ao Filo Firmicutes, como *Brevibacillus*, *Paenibacillus*, *Bacillus* and *Geobacillus*, mostraram atividade de carboximetilcelulase em temperaturas de até 75°C (Rastogi *et al.*, 2009). Estas enzimas termoestáveis podem ser utilizadas na indústria de biocombustíveis, levando a eficientes processos de sacarificação e fermentação da lignocelulose e consequente produção de bioetanol. Um cuidado na produção de bioetanol é a produção de compostos inibidores, tais como furanos, ácidos fracos e compostos fenólicos, gerados durante o tratamento termoquímico da biomassa vegetal (Parawira e Tekere, 2011). A inibição da fermentação de leveduras em hidrolisados lignocelulósicos pode ser minimizada pelo tratamento com enzimas lignocelulósicas. Uma estratégia desenvolvida por Parawira and Tekere (2011) foi clonar o gene da lacase em leveduras, tornando-as mais resistentes aos inibidores.

Além das modificações genéticas, inicialmente pode-se pesquisar a presença de estirpes ambientais que já possuam enzimas com as características desejáveis. Na abordagem metagenômica, pode ser construída uma biblioteca metagenômica de expressão de celulases. Este tipo de análise foi realizada por Kanokratana *et al.* (2015), que utilizaram a metagenômica para identificar genes de glicosil hidrolases, construindo uma biblioteca por clonagem num fosmídeo (vetor plasmidial, semelhante a cosmídeos, contendo genes do plasmídio F e sequências do fago λ). Avaliações destas bibliotecas podem ser feitas por meio de sequenciamento e pirossequenciamento (sequenciamento rápido de DNA detectado por emissão de fluorescência).

9.7.4. Ferramentas estatísticas na otimização da produção de enzimas

Uma excelente estratégia para otimizar a produção de enzimas e que vem sendo muito utilizada pelos pesquisadores é a ferramenta estatística do Planejamento Fatorial. Como vantagens, temos (i) a redução do número de experimentos, melhorando a qualidade da informação obtida; (ii) análise simultânea dos fatores, verificando e quantificando efeitos sinérgicos e antagônicos entre os fatores de interesse; (iii) otimização de mais de um fator ao mesmo tempo; e (iv) calcular e avaliar o erro experimental, especificando o nível de confiança estatística com o qual poderemos estimar a reprodutibilidade do resultado (Rodrigues e Iemma, 2009).

A escolha da melhor estratégia do planejamento fatorial depende principalmente do número de variáveis independentes que desejamos estudar e do conhecimento inicial do assunto. Uma das estratégias muito utilizadas para otimizar a produção de enzimas é o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR). Dependendo do número de variáveis independentes, o número de experimentos necessários também vai variar. O DCCR consiste em uma matriz contendo valores codificados lineares, quadráticos e centrais, como exemplificado na Tabela 9.5. Nota-se na

matriz que os valores do ponto central são repetidos no mínimo 3 vezes, de modo a dar maior validade estatística ao experimento.

Tabela 9.5

Matriz do Planejamento Fatorial DCCR, com 2 variáveis independentes, indicando os valores codificados e os valores reais para produção de celulases por *Stretomyces viridobrunneus* SCPE-09 por fermentação submersa

Ensaio	Valores codificados		Valores reais (% p/v)	
	X1	X2	X1	X2
1	– 1	– 1	1,0	0,4
2	+ 1	– 1	3,0	0,4
3	– 1	+ 1	1,0	1,4
4	+ 1	+ 1	3,0	1,4
5	– 1.41	0	0,59	0,9
6	+ 1.41	0	3,41	0,9
7	0	– 1.41	2,0	0,19
8	0	+ 1.41	2,0	1,59
9	0	0	2,0	0,9
10	0	0	2,0	0,9
11	0	0	2,0	0,9
12	0	0	2,0	0,9

Fonte: Da Vinha *et al.* (2011).

X1 (fonte de carbono – farelo de trigo ou bagaço de cana *in natura*)

X2 (fonte de nitrogênio – milhocina)

Outra estratégia é o Planejamento Fatorial Fracionado (FF). Contudo, seu uso depende do número de fatores ou variáveis, sendo que só podemos adotar este modelo, de forma confiável, quando se tem pelo menos 5 variáveis independentes para se estudar. Nesse caso, podemos adotar um 2^{5-1}, o qual originará 16 ensaios além de 4 ensaios no ponto central (Rodrigues e Iemma, 2009). É possível determinar o cálculo dos efeitos principais e indicações das variáveis que devem ser incluídas nos delineamentos seguintes, definindo novas faixas de estudo para cada variável (Tabela 9.6).

Tabela 9.6

Matriz do Planejamento Fatorial Fracionado 2^{5-1}, com 5 variáveis independentes, indicando os valores codificados e os valores reais para produção de enzimas

Ensaio	Valores codificados					Valores reais				
	X1	X2	X3	X4	X5	X1	X2	X3	X4	X5
1	− 1	− 1	− 1	− 1	+ 1	1,0%	0,5%	25°	100	7,0
2	+ 1	− 1	− 1	− 1	− 1	3,0%	0,5%	25°	100	5,0
3	− 1	+ 1	− 1	− 1	− 1	1,0%	1,5%	25°	100	5,0
4	+ 1	+ 1	− 1	− 1	+ 1	3,0%	1,5%	25°	100	7,0
5	− 1	− 1	+ 1	− 1	− 1	1,0%	0,5%	35°	100	5,0
6	+ 1	− 1	+ 1	− 1	+ 1	3,0%	0,5%	35°	100	7,0
7	− 1	+ 1	+ 1	− 1	+ 1	1,0%	1,5%	35°	100	7,0
8	+ 1	+ 1	+ 1	− 1	− 1	3,0%	1,5%	35°	100	5,0
9	− 1	− 1	− 1	+ 1	− 1	1,0%	0,5%	25°	200	5,0
10	+ 1	− 1	− 1	+ 1	+ 1	3,0%	0,5%	25°	200	7,0
11	− 1	+ 1	− 1	+ 1	+ 1	1,0%	1,5%	25°	200	7,0
12	+ 1	+ 1	− 1	+ 1	− 1	3,0%	1,5%	25°	200	5,0
13	− 1	− 1	+ 1	+ 1	+ 1	1,0%	0,5%	35°	200	7,0
14	+ 1	− 1	+ 1	+ 1	− 1	3,0%	0,5%	35°	200	5,0
15	− 1	+ 1	+ 1	+ 1	− 1	1,0%	1,5%	35°	200	5,0
16	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	+ 1	3,0%	1,5%	35°	200	7,0
17	0	0	0	0	0	2,0%	1,0%	30°	150	6,0
18	0	0	0	0	0	2,0%	1,0%	30°	150	6,0
19	0	0	0	0	0	2,0%	1,0%	30°	150	6,0
20	0	0	0	0	0	2,0%	1,0%	30°	150	6,0

X1 (fonte de carbono – farelo de trigo ou bagaço de cana *in natura*); X2 (fonte de nitrogênio – milhocina); X3 (temperatura °C); X4 (agitação RPM); X5 (pH)

Uma vez montada a planilha do Planejamento Fatorial e os dados experimentais obtidos, é realizada a análise estatística, utilizando um software, como o STATISTICA® (Statsoft Comp.). Dependendo do modelo, você pode obter análise de superfície de resposta, superfície de contorno, ANOVA, análise de efeitos, coeficiente de regressão. Da Vinha *et al.* (2011) avaliaram a produção de celulases por *S. viridobrunneus* SCPE-09 utilizando bagaço de cana-de-açúcar como fonte de carbono e milhocina como fonte de nitrogênio (Tabela 9.4). Ao fim de 5 dias de fermentação os resultados obtidos para atividade de endoglucanase variaram entre 0,238 e 1,101 U/mL. Estes resultados geraram um modelo matemático que permitiu a construção de um gráfico de superfície de resposta, como demonstrado na Figura 9.19.

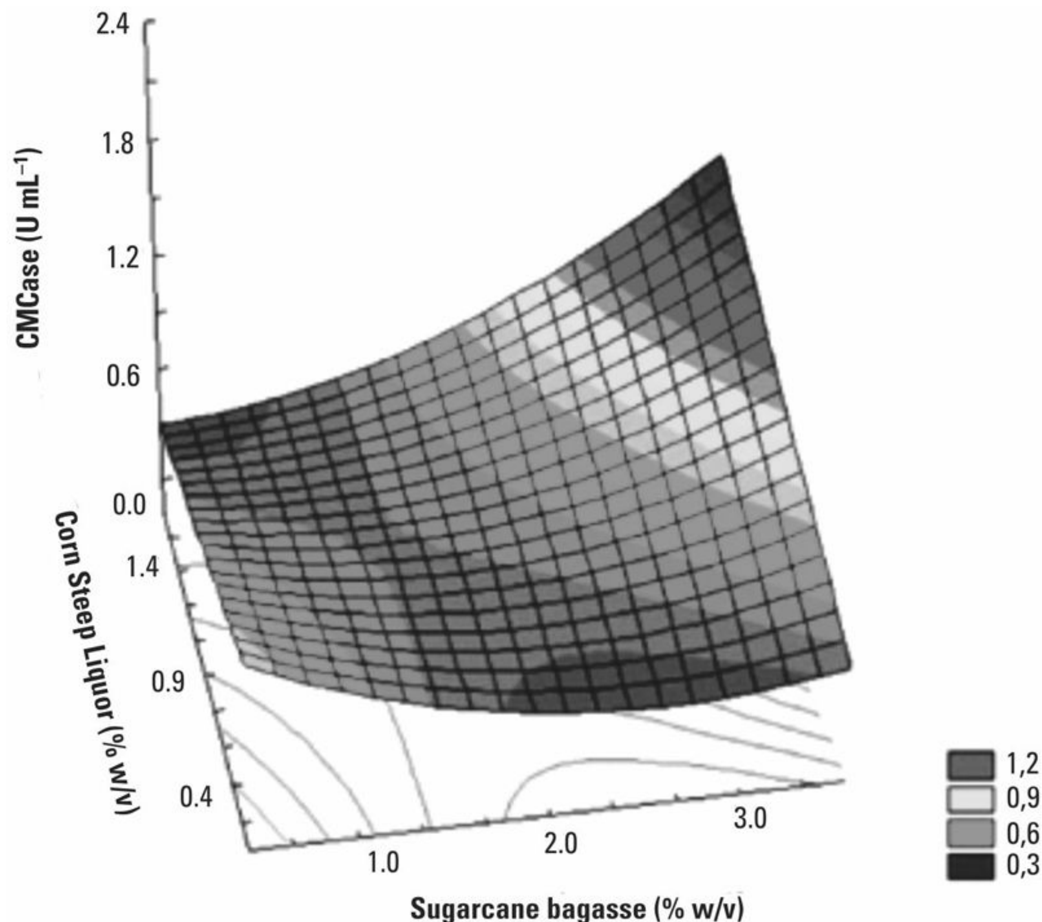


FIGURA 9.19 Superfície de Resposta (SR) da produção de endoglucanase pelo micro-organismo *S. viridobrunneus* SCPE-09 utilizando bagaço de cana (*sugarcane bagasse*) e milhocina (*corn steep liquor*) como variáveis independentes. *Fonte*: Da Vinha *et al.* (2011).

De acordo com os dados apontados pelo planejamento, há uma tendência de se obter valores maiores de atividade enzimática quando se aumenta as concentrações de bagaço e milhocina para valores superiores a 3% (p/v) e 1,5% (p/v), respectivamente. Nesse ponto é possível montar outra matriz com novos valores mais próximos do ótimo indicado ou, então, realizar uma validação simples dos experimentos, utilizando os valores indicados pela SR.

Dessa forma, dependendo da enzima, do micro-organismo e da forma de condução do processo, o uso do planejamento fatorial pode representar uma excelente ferramenta estatística no melhoramento da produção de enzimas, permitindo aumentar valores de produtividade e rendimento.

Revisão dos conceitos apresentados

- As enzimas possuem importantes aplicações na indústria de alimentos, bioenergia, ambiental, têxtil, farmacêutica e cosmética.

- As peptidases são hidrolases que clivam ligações peptídicas. São muito utilizadas na indústria de alimentos, detergentes e na indústria têxtil.
- As lipases são glicerol éster hidrolases (E.C. 3.1.1.3), que catalisam classicamente a hidrólise de ligações éster carboxílicas presentes em triacilgliceróis, liberando diacilgliceróis, monoacilgliceróis, glicerol e ácidos graxos. Em ambientes aquo-restritos, as lipases podem realizar reações reversas, de síntese, como esterificação, transesterificação e aminólise.
- A maioria das lipases possui uma tampa hidrofóbica cobrindo o seu sítio ativo, o qual é formado por uma tríade catalítica formada por serina, aspartato (ou glutamato) e histidina.
- Devido à grande versatilidade, as lipases podem ser aplicadas nos mais diversos ramos da indústria, como de alimentos, de detergente, de fármacos e química fina, de papel e celulose, de energia, entre outros.
- As amilases são carboidrases que hidrolisam as ligações glicosídicas α-1,4 e/ou α-1,6 encontradas no amido, no glicogênio e nos derivados de sacarídeos.
- As amilases podem ser usadas na indústria de detergentes, ração animal e produção de bioetanol.
- As transglutaminases são transferases que transferem grupos acila e fazem ligações covalentes isopeptídicas. São conhecidas como "colas" biológicas e têm sua principal aplicação na indústria de alimentos na produção de hambúrgueres e similares devido a sua capacidade de catalisar ligações cruzadas entre proteínas.
- As celulases e hemicelulases são enzimas de grande relevância que podem ser aplicadas em diferentes indústrias, sendo a bioenergética seu maior forte na atualidade. Seu processo de produção utiliza rejeitos do setor da agroindústria, podendo ser por processos submersos ou em estado sólido.
- As técnicas de engenharia genética podem aumentar a produção de enzimas, pela manipulação direta do gene estrutural, podem também aumentar ou reduzir a produção de um composto, por interferência na expressão das enzimas que participam desta via de síntese.
- Enzimas podem ser expressas em micro-organismos que permitam a sua obtenção em escala industrial. Contudo, deve-se escolher como hospedeiros micro-organismos que sejam considerados seguros (inócuos), que tenham sistema secretor compatível com as enzimas que se deseja produzir e é desejável que sejam de fácil cultivo nos fermentadores industriais.
- O uso do planejamento fatorial como ferramenta estatística para otimizar processos fermentativos de produção de enzimas é de grande utilidade. Assim, podemos combinar diferentes variáveis (nutrientes, pH, temperatura, aeração, inóculo) que podem permitir um maior aumento da expressão das enzimas e assim maior aplicabilidade em um aumento de escala industrial.

Questões

1. Como as enzimas podem ser classificadas?
2. Quais os critérios utilizados para a classificação das peptidases?
3. Cite três aplicações das peptidases que podemos detectar em nosso dia-a-dia.
4. Lipases e esterases são enzimas capazes de catalisar a hidrólise de ésteres. Qual a forma utilizada de diferenciar essas enzimas?
5. As lipases podem apresentar uma alta especificidade (régio-, enantio- ou quimio-) pelo seu substrato. Esta característica é requerida para aplicação em todos os ramos industriais? Explique e exemplifique.
6. O que são amilases?
7. Cite duas aplicações industriais deste grupo de enzimas
8. Quais a três principais reações catalisadas pelas transglutaminases?
9. Cite duas aplicações das transglutaminases na indústria de alimentos
10. Quais são os mecanismos de ação das celulases sobre a biomassa vegetal?
11. De que forma as celulases podem ser aplicadas na indústria têxtil?
12. Que estratégia você pode utilizar para aumentar a produção de enzimas em um sistema submerso? Justifique exemplificando um processo.

Tópicos para discussão e pesquisa

1. ATIVIDADE EM GRUPO: Pesquisar uma possível aplicação das lipases em uma das indústrias mencionadas no texto. Os estudantes deverão abordar se a utilização das lipases é ou não viável industrialmente, se o mesmo produto pode ser obtido por via química; se for possível, quais as vantagens e desvantagens da utilização de lipases na obtenção do produto em questão.
2. ATIVIDADE EM GRUPO: Pesquisar uma possível aplicação das lipases em uma das indústrias mencionadas no texto. Os estudantes deverão abordar se a utilização das lipases é ou não viável industrialmente, se o mesmo produto pode ser obtido por via química; se for possível, quais as vantagens e desvantagens da utilização de lipases na obtenção do produto em questão.
3. ATIVIDADE EM GRUPO: Pesquisar e elaborar uma estratégia de produção de celulases apresentando uma proposta de aplicação industrial em formato de projeto, indicando a relação custo X benefício do uso de enzimas em processos industriais.

Referências

Abd-Rabo FHR, EI-Dieb SM, Abd-El-Fattah AM, Sakr SS. Natural state changes of cows' and buffaloes' milk proteins inducedby microbial transglutaminase. *J Am Sci*. 2010;6:612–620.

Ageitos JM, Vallejo JA, Sestelo ABF. Purification and characterization of a milk-clotting protease from *Bacillus licheniformis* strain USC13. *Journal of Applied Microbiology*. 2007;103:2205–2213.

Ali, I.; Akbar, A.; Anwar, M.; Prasongsuk, S.; Lotrakul, P.; Punnapayak, H. 2015. Purification and characterization of a polyextremophilic α-Amylase from an obligate halophilic *Aspergillus penicillioides* isolate and its potential for souse with detergents. BioMed Research International. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1155/2015/245649.

Aloulou A, Rodriguez JA, Fernandez D, van Oosterhout D, Puccinelli D, Carrière F. Exploring the specific features of interfacial enzymology based on lipase studies. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*. 2006;1761(9):995–1013.

Amoozegar MA, Malekzadeh F, Malik KA. Production of amylase by newly isolated moderate halophile, *Halobacillus* sp. strain MA-2. *J Microbiol Methods*. 2003;52:353–359.

Anbu, P.; Gopinath, S.C.; Chaulagain, B.P.; Tang, T.H.; Citartan, M. 2015. Microbial Enzymes and Their Applications in Industries and Medicine 2014. Bio Med Research International. Disponível em: http://dx.doi.org/10.1155/2015/816419.

Ando H, Adachi M, Umeda K, Matsura A, Nonaka M, Uchio R, Tanaka H, Motoki M. Purification and characteristics of novel food transglutaminase derived from microorganism. *Agric Biol Chem*. 1989;53:2613–2617.

Andrade JP, Bispo ASR, Marbach PAS, Nascimento RP. Production and partial characterization of cellulases from Trichoderma sp. IS-05 isolated from Sandy coastal plains of Northeast Brazil. *Enzyme Research*. 2011;2011:01–07. doi: 10.4061/2011/167248.

Andreaus J, Cavaco-Paulo A. Enzimas no processamento de fibras têxteis. In: Bon EPS, Corvo ML, Vermelho AB, Paiva CLA, Ferrara MA, Coelho RRR, eds. *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro: Interciência Brasil; 2008:179–204.

Anobom CD, Pinheiro AS, De-Andrade RA, Aguieiras ECG, Andrade GC, Moura MV, Almeida RV, Freire DMG. From structure to catalysis: recent developments in the biotechnological applications of lipases. *BioMed Research International*,. 2014: 684506.

Arshad ZIM, Amid A, Yusof F, Jaswir I, Ahmad K, Loke SP. Bromelain: an overview of industrial application and purification strategies. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98:7283–7297.

Ashforth EJ. Genetic engineering and enzyme research in lignocellulosic ethanol production. *Protein Cell*. 2011;2(10):776–777.

Baumert H, Simon P, Hekmati M, Fromont G, Levy M, Balaton A, Molinié V, Malavaud B. Development of a seeded scaffold in the greatomentum: feasibility of an in vivo bioreactor for bladder tissue engineering. *Eur Urol*. 2007;52:884–892.

Beganović J, Kos B, Leboš Pavunc A, Uroić K, Džidara P, Šušković J. Proteolytic activity of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Anaerobe*. 2013;20:58–64.

Ben EM, Zaraî JN, Rekik H, Bejar W, Boulkour TS, Hmidi M, Badis A, Bejar S, Jaouadi B. A novel detergent-stable solvent-tolerant serine thiol alkalineprotease from *Streptomyces koyangensis* TN650. *Int J Biol Macromol*. 2015;79:871–882.

Benjamin S, Smitha RB, Jisha VN, Pradeep S, Sajith S, Sreedevi S, Priji P, Unni KN, Josh MKS. A monograph on amylases from *Bacillus* spp. *Adv Biosci Biotechnol*. 2013;4:227–241.

Berglund, P.; Hult, K. 2000. Biocatalytic synthesis of enantiopure compounds using lipases: Chapter 21. In: Stereoselective Biocatalysis. New York: Marcel Dekker. p. 633-57. ISBN: 0-8247-8282-8.

Bertoldo C, Antranikian G. Starch hydrolyzing enzymes from thermophilic archaea and bacteria. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2002;6:151–160.

Bhat MK. Cellulases and related enzymes in biotechnology. *Biotechnol Adv*. 2000;18:355–383.

Bien TLT, Tsuji S, Tanaka K, Takenaka S, Yoshida K-I. Secretion of heterologous thermostable cellulases in *Bacillus subtilis*. *J Gen Appl Microbiol*. 2014;60:175–182.

Boisvert H, Duncan MJ. Translocation of *Porphyromonas gingivalis* gingipain adhesin peptide A44 to host mitochondria prevents apoptosis. *Infect Immun*. 2010;78(8):3616–3624: doi:10.1128/IAI.;1; 00187-10. Epub 2010 Jun 14.

Bommarius AS, Sohn M, Kang Y, Lee J, Realff H, J M. Protein engineering of cellulases. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014;29:139–145.

Bon EPS, Gírio F, Pereira-Jr N. Enzimas na produção de etanol. In: Bon EPS, Corvo ML, Vermelho AB, Paiva CLA, Ferrara MA, Coelho RRR, eds. *Enzimas em Biotecnologia: Produção, Aplicações e Mercado*. Rio de Janeiro: Interciência Brasil; 2008:241–271.

Bon EP, Vermelho AB. *Queratinases. Enzimas como Agentes Biotecnológicos*. Rio de Janeiro: Legis Summa; 2004.

Bornscheuer UT. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis. *Fems Microbiology Reviews*. 2002;26(1):73–81.

Bourneow C, Benjakul S, Sumpavapol P, H-Kittikun A. Isolation and cultivation of transglutaminase producing bacteria from sea food processing factories. *Innovat Rom Food Biotechnol*. 2001;10:28–39.

Bozic N, Ruiz J, López-Santín J, Vujcic Z. Production and properties of the highly efficient raw starch digesting α-amylase from a *Bacillus licheniformis* ATCC 9945a. *Biochemical Engineering Journal*. 2011;53:203–209.

Brady L, Brzozowski AM, Derewenda ZS, Dodson E, Dodson G, Tolley S. A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature*. 1990;343:767–770.

Brandelli A, Sala L, Kalil SJ. Microbial enzymes for bioconversion of poultry waste into added-value products. *Food Research International*. 2015;73:3–12.

Braz AV, Sakuma TH. *Enzimas Cosmecêuticas. In: Costa, A. organizador. Tratado Internacional de Cosmecêuticos*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.

Brophy CM, Nyberg SL. Is there a future for the bioartificial liver? *Curr Opin Organ Transplant*. 2006;11:219–225.

Bussamara R, Fuentefria AM, Oliveira ES, Broetto L, Simcikova M, Valente P, Schrank A, Vainstein MH. Isolation of a lipase-secreting yeast for enzyme production in a pilot-plant scale batch fermentation. *Bioresource Technol*. 2010;101:268–275.

Calcott MJ, Ackerley DF. Genetic manipulation of non-ribosomal peptide synthetases to generate novel bioactive peptide products. *Biotechnol Lett*. 2014;36:2407–2416.

Campàs M, Prieto-Simón B, Marty J-L. A review of the use of genetically engineered enzymes in electrochemical Biosensors. *Seminars in Cell & Developmental Biology*. 2009;20:3–9.

Carrasco-Lopez C, Godoy C, De Las Rivas B, Fernandez-Lorente G, Palomo JM, Guisan JM. Activation of bacterial thermoalkalophilic lipases is spurred by dramatic structural rearrangements. *Journal of Biological Chemistry*. 2009;284:4365–4372.

Castro AM, Ribeiro BD. *Methods for Detection of Amylolytic Activities. Methods to Determine Enzymatic Activity*. A.B. Vermelho e S. Couri: Bentham Science; 2013.

Castro AM, Carvalho MLA, Leite SGF, Pereira Junior N. Cellulases from *Penicillium funiculosum*: production, properties and application to cellulose hydrolysis. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2010;37:151–158.

Chantasingh D, Pootanakit K, Champreda V, Kanokratana P, Eurwilaichitr L. Cloning, expression, and characterization of a xylanase 10 from *Aspergillus terreus* (BCC129) in *Pichia pastoris*. *Prot Exp Pur*. 2006;46:143–149.

Cavaco-Paulo, A. 1998. In: Enzyme Applications in Fiber Processing. ACS Symposium Series, 687: 180-9.

Cavicchioli R, Charlton T, Ertan H, Omar SM, Siddiqui KS, Williams TJ. Biotechnological uses of enzymes from psychrophiles. *Microbial Biotechnology*. 2011;4(4):449–460.

Coelho, M.A.Z.; Salgado, A.M.; Ribeiro, B.D. 2008. Introdução a Enzimologia. In: Tecnologia Enzimática. EPUB, FAPERJ, p. 8-16.

Chau DYS, Collighan RJ, Verderio EA, Addy AL, Griffin M. The cellular response to transglutaminase-cross-linked collagen. *Biomaterials*. 2005;26(33):6518–6529.

Choi, J-M.; Han, S-S.; Kim, H-S. 2015. Industrial applications of enzyme biocatalysis: Current status and future aspects. Biotechnology Advances. doi:10.1016/j.biotechadv.2015.02.014.

Claverie-Martín, F.; Vega-Hernández, M.C. 2007. Aspartic Proteases Used in Cheese Making Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. Polaina J. and MacCabe A.P. Springer. ISBN: 978-1-4020-5377-1.

Colen G, Junqueira RG, Moraes-Santos T. Isolation and screening of alkaline lipase-producing fungi from Brazilian savanna soil. *World J Microb Biot*. 2006;22:881–885.

Coronado M, Vargas C, Hofemeister J, Ventosa A, Nieto JJ. Production and biochemical characterization of analpha-amylase from the moderate halophile *Halomonas meridian*. *FEMS Microbiol Lett*. 2000;183:67–71.

Czkowski JK. Transglutaminase – an enzyme group of extended metabolic and application possibilities. *Pol J Food Nutr Sci*. 2005;14/55(1):3–12.

Deutch CE. Characterization of a salt-tolerant extracellular α-amylase from *Bacillus dipsosauri*. *Lett Appl Microbiol*. 2002;35:78–84.

Divakar, S.; Manohar, B. 2007. Use of Lipases In The Industrial Production Of, Esters, In : Polaina, J., Maccabe, A., editors. Industrial Enzymes: Springer

Netherlands. cap. 17, p. 283-300. ISBN: 978-1-4020-5376-4.

Djekrif-Dakhmouche S, Gheribi-Aoulmi Z, Meraihi Z, Bennamoun L. Application of a statistical design to the optimization of culture medium for α-amylase production by *Aspergillus niger* ATCC 16404 grown on orange waste powder. *J Food Process Eng*. 2006;73:190–197.

Doman-Pytka M, Bardowski J. Pullulan degrading enzymes of bacterial origin. *Critical Reviews in Microbiology*. 2004;30(2):107–121.

Donlon, J. 2007. Subtilisin. Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. Polaina J. and MacCabe A.P. Springer. ISBN: 978-1-4020-5377-1.

Du GC, Cui L, Zhu Y, Chen J. Improvement of shrink-resistance and tensile strength of wool fabric treated with a novel microbial transglutaminase from Streptomyces hygroscopicus. *Enzyme Microb Technol*. 2007;40:1753–1757.

Dubey R, Adhikary S, Kumar J, Sinha N. Isolation, Production, Purification, Assay and Characterization of Alkaline Protease Enzyme from Aspergillus niger and its Compatibility with Commercial Detergents. *Developmental Microbiology and Molecular Biology*. 2010;1:75–94.

El-Ghonemy, D.H; Ali, T.H.; El-Bondkly, A.M.; Moharam, M.E-S.; Talkhan, F.N. 2014. Improvement of *Aspergillus oryzae* NRRL 3484 by mutagenesis and optimization of culture conditions in solid-state fermentation for the hyper-production of extracellular cellulose. Antonie van Leeuwenhoek, 106: 853-64. Enzyme Microbiol Technol, 2: 91-102.

Fagundes NS, Caires CM, Fagundes NS, Benedetti E. Enzimas na alimentação de ruminantes. *Revista Eletrônica Nutritime*. 2008;5(1):498–503.

Feller, G. 2013. Psychrophilic Enzymes: From Folding to Function and Biotechnology Scientifica. ID 512840: 28. doi:10.1155/2013/512840.

Fojan P, Jonson PH, Petersen MTN, Petersen SB. What distinguishes an esterase from a lipase: A novel structural approach. *Biochimie*. 2000;82(11):1033–1041.

Freire, D.M.G.; Castilho, L.R. 2008. Lipases em Biocatálise. In :, B.O.N., E.P.S., Ferrara, M.A., et, al., Editors. Enzimas em Biotecnologia. Produção, Aplicações e Mercado. Rio de Janeiro: Editora Interciência, v.1, p. 369-85.

Fukushima T, Mizuki T, Echigo A, Inoue A, Usami R. Organic solvent tolerance of halophilic α-amylase from a Haloarchaeon, *Haloarcula* sp. strain S-1. *Extremophiles*. 2005;9:85–90.

George N, Sondhi S, Soni SK, Gupta N. Lime and Sulphide-Free Dehairing of Animal Skin Using Collagenase-Free Alkaline Protease from *Vibrio metschnikovii* NG155. *Indian J Microbiol*. 2014;54(2):139–142.

Godoy MG, Gutarra MLE, Castro AM, Machado OLT, Freire DMG. Adding value to a toxic residue from the biodiesel industry: production of two distinct pool of lipases from *Penicillium simplicissimum* in castor bean waste. *J Ind Microbiol Biot*. 2011;38:945–953.

Gohel SD, Singh SP. Thermodynamics of a Ca (2+)-dependent highly thermostable alkaline protease from a haloalkliphilic actinomycete. *Int J Biol Macromol*.

2015;72:421–429.

Golan AE. *Cellulase. Types and Action, Mechanisms and Uses*. New York: Nova Science Publishers; 2011: ISBN: 978-1-61761-983.

Goyal M, Kalra KL, Sarren VK, Soni G. Xylanase production with xylan rich lignocellulosic wastes by a local soil isolate of *Trichoderma viride*. *Braz J Microbiol*. 2008;39:535–541.

Grigorevski-Lima AL, Nascimento RP, Bon EPS, Coelho RRR. Streptomyces drozdowiczii cellulase production using agro-industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. *Enz Microb Technol*. 2005;37:272–277.

Grigorevski-Lima AL, Da Vinha FNM, Bispo ASR, Bon EPS, Coelho RRR, Nascimento RP. *Aspergillus fumigatus* thermophilic and acidophilic endoglucanases. *Appl Biochem Biotech*. 2009;155:321–329.

Grigorevski-Lima AL, Oliveira MMQ, Nascimento RP, Bon EPS, Coelho RRR. Production and characterization of cellulases and xylanases from *Trichoderma atroviride* 676 using lignocellulosic residual biomass. *Appl Biochem Biotechnol*. 2013;169:1373–1385.

Grzonka, Z.; Kasprzykowski, F.; Wiczk, W. 2007. Cysteine Proteases. Industrial Enzymes: Structure, Function and Applications. Polaina J. and MacCabe A.P. Springer. ISBN: 978-1-4020-5377-1.

Gu P, Yang F, Li F, Liang Q, Qi Q. Knocking out analysis of tryptophan permeasesin *Escherichia coli*for improving L-tryptophan production. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97:6677–6683.

Gupta R, Beg QK, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecular approaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002;59:15–32.

Gupta R, Beg QK, Lorenz P. Bacterial alkaline proteases: molecularapproaches and industrial applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002;59:15–32.

Gupta R, Gigras P, Mohapatra H, Goswami VK, Chauhan B. Microbial α-amylases: a biotechnological perspective. *Process Biochemistry*. 2003;00:1–18.

Gupta R, Kumari A, Syal P, Singh Y. Molecular and functional diversity of yeast and fungal lipases: Their role in biotechnology and cellular physiology. *Progress in Lipid Research*. 2015;57:40–54.

Haki GD, Rakshit SK. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresour Technol*. 2003;89:17–34.

Hao JH, Sun M. Purification and characterization of a cold alkaline protease from a psychrophilic Pseudomonas aeruginosa HY1215. *Appl Biochem Biotechnol*. 2015;175(2):715–722.

Hata, K.; Matsukura, M.; Taneda, H.; Fujita, Y. 1996. Mill-scale application of enzymatic pitch control during paper production. In : Viikari, L., Jeffries, T.W., editors. Enzymes Pulp Paper Processing. p. 280-296.

Ho ML, Leu SZ, Hsieh JF, Jiang ST. Technical approach to simplify the purification method and characterization of microbial transglutaminase produced form *Streptoverticillium ladakanum*. *J Food Sci*. 2000;65:76–80.

Hutcheon GW, Vasisht N, Bolhuis A. Characterisation of a highly stable alpha-amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. *Extremophiles*. 2005;9:487–495.

Illanes A, Cauerhff A, Wilson L, Castro GR. Recent trends in biocatalysis engineering. *Bioresource Technology*. 2012;115:48–57.

Jaeger KE, Eggert T. Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002;13(4):390–397.

Jaeger KE, Reetz MT. Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 1998;16(9):396–403.

Jaouadi B, Ellouz-Chaabouni S, Rhimi M, Bejar S. Biochemical and molecular characterization of a detergent-stable serine alkaline protease from *Bacillus pumilus* CBS with high catalytic efficiency. *Biochimie*. 2008;90:1291–1305.

Jenn-Kan, L.; Hsin-Mei, W.; Xuan-Rui, X. 2016. Applications of surfactin in cosmetic products. Patent number: US2016030322.

Jisha VN, Smitha RB, Pradeep S, Sreedevi S, Unni KN, Sajith S, Priji P, Josh MS, Benjamin S. Versatility of microbial proteases. *Advances in Enzyme Research*. 2013;1(3):39–51.

Johnson EA, Sakajoh M, Halliwell G, Madia A, Deinain AL. Saccharification of complex cellulosic substrates by the cellulase system of *Clostridium thermocellum*. *Appl Environ Microbiol*. 1982;43:1125–1132.

Joo H, Chang C. Production of an SDS-stable alkaline protease form an alkalophilic *Bacillus clausii* I-52 by submerged fermentation: Feasibility as a laundry detergent additive. *Enzyme and Microbiol Technology*. 2006;38:176–183.

Joshi S, Satyanarayana T. *In vitro* engineering of microbial enzymes with multifarious applications: Prospects and perspectives. *Bioresource Technology*. 2015;176:273–283.

Kanayama Y, Sakai Y. Purification and properties of a new type of protease produced by *Microbacterium liquefaciens*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2005;69(5):916–921.

Kanokratana P, Eurwilaichitr PL, Pootanakit K, Champreda V. Identification of glycosyl hydrolases from a metagenomic library of microflora in sugarcane bagasse collection site and their cooperative action on cellulose degradation. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2015;119(4):384–391.

Kapoor M, Gupta MN. Lipase promiscuity and its biochemical applications. *Process Biochemistry*. 2012;47:555–569.

Kathiresan K, Manivannan S. α-Amylase production by *Penicillium fellutanum* isolated from mangrove rhizosphere soil. *African J Biotechnol*. 2006;5:829–832.

Kaulpiboon J, Prasong W, Rimphanitchayakit V, Murakami S, Aoki K, Pongsawasdi P. Expression and characterization of a fusion containing

cyclodextrin glycosyltransferase from *Paenibacillus* sp. A11. *Journal of Basic Microbiology*. 2010;50(5):427–435.

Kaur B, Oberoi HS, Chadha BS. Enhanced cellulase producing mutants developed from heterokaryotic Aspergillus strain. *Biores Technol*. 2014;156:100–107.

Kieliszek M, Misiewicz AF. Microbial transglutaminase and its application in the foodindustry. *A review. Microbiol*. 2014;59:241–250: doi:10.1007/s12223-013-0287-x.

Kim HS, Jung S-H, Lee I-S, Yu T-S. Production and characterization of a novel microbial transglutaminase from *Actinomadura* sp. T-2. *J Microbiol Biotechnol*. 2000;10:187–194.

Kitayska T, Petrova P, Ivanova V, Tonkova AI. Purification and properties of a new Thermostable cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus pseudalcaliphilus* 8SB. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2011;165:1285–1295.

Koga Y, Tanaka S, Sakudo A, Tobiume M, Aranishi M, Hirata A, Takano K, Ikuta K, Kanaya S. Proteolysis of abnormal prion protein with a thermostable protease from *Thermococcus kodakarensis* KOD1. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(5):2113–2120.

Konsoula Z, Liakopoulou-Kyriakides M. Co-production of alphaamylase and beta-galactosidase by *Bacillus subtilis* in complex organicsubstrates. *Bioresour Technol*. 2007;98:150–157.

Kranthi VS, Rao DM, Jaganmohan P. Production of Protease by Aspergillus flavus Through Solid State Fermentation Using Different Oil Seed Cakes. *Int J Microbiol Res*. 2012;3:12–15.

Kuddus M, Roohi A, Arif JM, Ramteke PW. An Overview of cold-active Microbial α-amylase: Adaptation Strategies and Biotechnological Potentials. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2011;10:246–258.

Kumar SS, Gupta R. An extracellular lipase from Trichosporon asahii MSR 54: Medium optimization and enantioselective deacetylation of phenyl ethyl acetate. *Process Biochem*. 2008;43:1054–1060.

Kyaw N, de Mesquita RF, Kameda E, Neto JC, Langone MA, Coelho MA. Characterization of commercial amylases for the removal of filter cake on petroleum wells. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010;161(1–8):171–180.

Lall BM, Paul JS, Jadhav SK. Effect of incubation period (with static and shaking condition) on amylase production from *Aspergillus flavus*. *Advances in Biological Research*. 2015;9(1):01–06.

Langston J, Blinkovsky A, Byun T, Terribilini M, Ransbarger D, Xu F. Substrate specificity of *Streptomyces transglutaminases*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2007;136:291–308.

Le Corre D, Bras J, Dufresne A. Starch nanoparticles: a review. *Biomacromol*. 2010;11:1139–1153.

Li H, Zhang L, Cui Y, Luo X, Xue C, Wang S. Expression of soluble recombinant transglutaminase from Zea mays in Pichia pastoris. *World J. Microbiol Biotechnol*.

2013;29(5):939–947.

Li X, Yu H. Extracellular production of beta-amylase by a halophilic isolate, *Halobacillus* sp. LY9. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2011;38:1837–1843.

Liu S, Fang Y, Lv M, Wang S, Chen L. Optimization of the production of organic solvent-stable protease by *Bacillus sphaericus* DS11 with response surface methodology. *Bioresour Technol*. 2010;101(20):7924–7929.

Lorand JB, Pilkington TR, Lorand L. Inhibitors of fibrin cross-linking: relevance for thrombolysis. *Nature*. 1966;18210(5042):1273–1274: Disponível em: ncbi.nlm.nih.gov.

Lotti, M.; Alberghina, L. 2007. Lipases: Molecular Structure and Function. In : Polaina, J., Maccabe, A., editors. Industrial Enzymes: Springer Netherlands, 2007. cap. 16, p. 263-81. ISBN: 978-1-4020-5376-4.

Lv X, Zheng F, Li C, Zhang W, Chen G, Liu W. Characterization of a copper responsive promoter and its mediated overexpression of the xylanase regulator 1 results in an induction-independent production of cellulases in *Trichoderma reesei*. *Biotechnology for Biofuels*. 2015;8:67.

Madan B, Mishra P. Directed evolution of Bacillus licheniformis lipase for improvement of thermostability. *Biochem Eng J*. 2014;91:276–282.

Makarova KS, Aravind L, Koonin EV. A superfamily of archaeal, bacterial, and eukaryotic proteins homologous to animal transglutaminases. Transglutaminase homologs in Archaea and Bacteria. *Protein Science*. 1999;8:1714–1719.

Maki M, Leung KT, Qin W. The prospects of cellulase producing bacteria for the bioconversion of lignocellulosic biomass. *Int J Biol Sci*. 2009;5:500–516.

Makrides S. Strategies for achieving high level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1996;60:512–538.

Martins IM, Matos M, Costa R, Silva F, Pascoal A, Estevinho LM, Choupina AB. Transglutaminases: recent achievements and new sources. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2014;98(16):6957–6964: doi:10.1007/s00253-014-5894-1.

Martins ML, Pinto UM, Riedel K, Vanetti MC. Milk-deteriorating exoenzymes from Pseudomonas fluorescens 041 isolated from refrigerated raw milk. *Braz J Microbiol*. 2015;46(1):207–217.

Matias CFQ, Rocha JSR, Pompeu MA, Baião RC, Baião NC, Lara LJC, Clímaco WLS, Pereira LFP, Caldas EO, Teixeira MPF, Cardeal PC. Effect of protease on the metabolization coefficient of nutrients in broilers. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2015;67(2):492–498.

Mazan M, Farkas V. Transglutaminase-like activity participates in cell wall biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biologia, Bratislava*. 2007;62(2):128–131.

Mazotto AM, Cedrola SM, Lins U, Rosado AS, Silva KT, Chaves JQ, Rabinovitch L, Zingali RB, Vermelho AB. Keratinolytic activity of *Bacillus subtilis* AMR using human hair. *Letters in Applied Microbiology*. 2010;50(1):89–96.

Mazotto, A.M.; Coelho, R.R.R.; Cedrola, S.M.L.; Lima, M.F.; Couri, S.; Souza, E.P.; Vermelho, A.B. 2011. Keratinase production by three *Bacillus* spp. using feather meal and whole feather as substrate in a submerged fermentation. Enzyme Research. doi:10.40612011523780.

MEROPS. 2012. Disponível em: http://merops.sanger.ac.uk. Acesso em 3 de janeiro de 2012.

Mitsunaga, H.; Meissner, L.; Palmen, T.; Bamba, T.; Büchs, J.; Fukusaki, E. 2015. Metabolome analysis reveals the effect of carbon catabolite control on the poly (-glutamic acid) biosynthesis of Bacillus licheniformis ATCC 9945. Journal of Bioscience and Bioengineering. In Press, Corrected Proof. Acesso em 26 de setembro de 2015.

Mobini-Dehkordi M, Nahvi I, Zarkesh-Esfahani H, Ghaedi K, Tavassoli M, Akada R. Isolation of a novel mutant strain of *Saccharomyces cerevisiae* by ethyl methyl sulfonate mutagenesis approach as a high producer of bioethanol. *J Biosci Bioengin*. 2008;105:403–408.

Mohapatra BR, Bapuji M, Sree A. Production of industrial enzymes (amylase, carboxymethylcellulase and protease) by bacteria isolated from marine sedentary organisms. *Acta Biotechnol*. 2003;23:75–84.

Motoki M, Seguro K. Transglutaminase and its use for food processing. *Trends in Food Science & Technology*. 1998;9:204–210.

Mouad AM, Porto ALM. Uma abordagem química sobre a pele e a biocatálise no desenvolvimento de moléculas antioxidantes de aplicação cosmética. *Revista Virtual de Química*. 2014;6(6):1642–1660.

Nagy V, Szakacs G. Production of transglutaminase by Streptomyces isolates in solid-state fermentation. *Letters in Applied Microbiology*. 2008;47:122–127.

Naidu MA, Saranraj P. Bacterial Amylase: A review. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives*. 2013;4(2):274–287.

Nair SG, Sindhu R, Shashidhar S. Enzymatic bleaching of Kraft pulp by xylanase from *Aspergillus sydowii* SBS45. *Indian J Microbiol*. 2010;50:332–338.

Nagar S, Jain RK, Thakur VV, Gupta VK. Biobleaching application of cellulase poor and alkali stable xylanase from Bacillus pumilus SV-85S. *Biotech*. 2013;3:277–285.

Nascimento RP, Junior NA, Coelho RRR. Brewer's spent grain and corn steep liquor as alternative culture medium substrates for proteinase production by *Streptomyces malaysiensis* AMT-3. *Braz J Microbiol*. 2011;42:1384–1389.

Nascimento RP, Coelho RRR, Marques S, Alves L, Gírio FM, Bon EPS, Amaral-Collaço MT. Production and partial characterisation of xylanase from *Streptomyces* sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil. *Enz Microb Technol*. 2002;31:549–555.

Natsch A, Gfeller H, Gygax P, Schmid J. Isolation of a bacterial enzyme releasing axillary malodor and its use as a screening target for novel deodorant formulations. *International Journal of Cosmetic Science*. 2005;27:115–122.

Nghiem NP, Taylor F, Johnston DB, Shetty JK, Hicks KB. Scale-up of ethanol production from winter barley by the EDGE (enhanced dry grind enzymatic) process in fermentors up to 300 l. *Appl Biochem Biotechnol*. 2011;165(3–4):870–882.

Ngt T, Zeikus JG. Comparison of Extracellular Cellulase Activities of *Clostridium thermocellum* LQRI and *Trichoderma reesei* QM9414. *Applied And Environmental Microbiology*. 1981;42(2):231–240.

Olempska-Beer ZS, Merker RI, Ditto MD, DiNovi MJ. Food-processing enzymes from recombinant microorganisms a review. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. 2006;45:144–158.

Öner ET. Optimization of ethanol production from starch by an amylolytic nuclear petite Saccharomyces cerevisiae strain. *Yeast*. 2006;23:849–856.

OOPEC – Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg. 2002. Collection of information on enzymes in Technical Aspects of Enzymes Enzymes in Cosmetics, 3: 33.

Oren A. Industrial and environmental applications of halophilic microorganisms. *Environ Technol*. 2010;31:825–834.

Parawira W, Tekere M. Biotechnological strategies to overcome inhibitors in lignocellulose hydrolysates for ethanol production: review. *Crit Rev Biotechnol*. 2011;31:20–31.

Perez-Pomares F, Bautista V, Ferrer J, Pire C, Marhuenda-Egea FC, Bonete MJ. α-Amylase activity from the halophilic archaeon *Haloferax mediterranei*. *Extremophiles*. 2003;7:299–306.

Pian, J.G.; Zheng, J.G.; Jiang, H.; Hao, H.; Yuan, Y.; Jiang, Y.; Yang, M. 2015. The Journal of Biological Chemistry, 290(31): 19081-92.

Pitman, S. 2011. Growth-in-enzymes-market-driven-by-cosmetics-demand. http://www.cosmeticsdesign-asia.com/Formulation-Science/Growth-in-enzymes-market-driven-by-cosmetics-demand. Acesso em 19 de outubro de 2015.

Pongsawasdi P. Expression and characterization of a fusion protein- properties of a new Thermostable cyclodextrin glucanotransferase from *Bacillus pseudalcaliphilus* 8SB. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2010;165:1285–1295.

Prakash B, Vidyasagara M, Madhukumarb MS, Muralikrishnab G, Sreeramulu K. Production, purification, and characterization of two extremely halotolerant, thermostable, and alkali-stable α-amylases from *Chromohalobacter* sp. TVSP 101. *Process Biochem*. 2009;44:210–215.

Prakash O, Jaiswal N. Alpha-Amylase: an ideal representative of thermostable enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010;160(8):2401–2414.

Qin B, Liang P, Jia X, Zhang X, Mu M, Wang XY, Ma GZ, Jin DN, You S. Directed evolution of *Candida antarctica* lipase B for kinetic resolution of profen esters. *Catal Commun*. 2013;38:1–5.

Rachel NM, Pelletier JN. Biotechnological applications of transglutaminases. *Biomolecules*. 2013;22-3(4):870–888: doi:10.3390/biom3040870.

Ram MS, Singh L, Alam SI, Aggarwal MK. Extracellular protease from *Bacillus coagulans*, a psychrotrophic, Antarctic bacterium. *World J Microbiol Biotechnol*. 1994;10(3):356–357.
Ram MS, Singh L, Alam SI, Aggarwal MK. Extracellular protease from *Bacillus coagulans*, a psychrotrophic, Antarctic bacterium. *World J Microbiol Biotechnol*. 1994;10(3):356–357.
Rao MB, Tanksale AM, Ghatge MS, Deshpande VV. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. Microbiology and molecular. *Biology Reviews*. 1998;98:1092–2198.

Rastogi G, Muppidi GL, Gurram RN, Adhikari A, Bischoff KM, Hughes SR, Apel WA, Bang SS, Dixon DJ, Sani RK. Isolation and characterization of cellulose-degrading bacteria from the deep subsurface of the Homestake gold mine, Lead, South Dakota, USA. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2009;36:585–598.

Rawlings ND, Barrett AJ. Evolutionary families of peptidases. *Biochemical Journal*. 1993;290:205–218.

Rawlings ND, Waller M, Barrett AJ, Bateman A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids*. 2014;42:503–509.

Rawlings ND, Morton FR, Kok CY, Kong J, Barrett AJ. MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Research*. 2007;36:320–325.

Ray A. Application of lipase in industry. *Asian Journal of Pharmaceutical Technology and Innovation*. 2012;2:33–37.

Riaz M, Perveen R, Javed MR, Nadeem H, Rashid MH. Kinetic and thermodynamic properties of novel glucoamylase from *Humicola* sp. *Enzyme and Microbial Technology*. 2007;41:558–564.

Rodrigues MI, Iemma AF. *Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos*. 2ª ed. Campinas: Editora Casa do Pão; 2009: 01-177.

Rossa PN, De Sa EMF, Burin VM, Bordignon-Lui MT. Optimization of microbial transglutaminase activity in ice cream using response surface methodology. *Food Sci Technol*. 2011;44:29–34.

Ruiz-Herrera J, Iranzo M, Elorza MV, Sentandreu R, Mormeneo S. Involvement of transglutaminase in the formation of covalent cross-links in the cell wall of *Candida albicans*. *Arch Microbiol*. 1995;164(3):186–193.

Ryan SM, Fitzgerald GF, Sinderen D. Screening for identification of starch, amylopectin and pullulan degrading activities in Bifidobacteria strains. *Applied Environmental Microbiology*. 2011;72(8):5289–5296.

Ryu DD, Mandels M. Cellulases: biosynthesis and applications. *Enzyme and Microbial Technology*. 1980;2:91–102.

Said S, Pietro RCLR. Generalidades sobre a aplicação industrial de enzimas. In: Said S, Pietro RCLR, eds. *Enzimas como agentes biotecnológicos*. Ribeirão Preto:

Legis Summa; 2004.

Salis B, Spinetti G, Scaramuzza S, Bossi M, Jotti GS, Tonon G, Crobu D, Schrepfer R. High-level expression of a recombinant active microbial transglutaminase in *Escherichia coli*. *BMC Biotechnology*. 2015;15:84: doi:10.1186/s12896-015-0202-4.

Santos ER, Teles ZNS, Campos NM, Souza DAJ, Bispo ASR, Nascimento RP. Production of alfa-amylase from *Streptomyces* sp. SLBA-08 strain using agro-industrial by-products. *Brazilian Archives of Biology and Technology*. 2012;55:793–800.

Sari E, Loğoğlu E, Öktemer A. Purification and characterization of organic solvent stable serine alkaline protease from newly isolated *Bacillus circulans* M34. *Biomed Chromatogr*. 2015;29(9):1356–1363.

Sathishkumar R, Ananthan G, Iyappan K, Stalin C. A statistical approach for optimization of alkaline lipase production by ascidian associated – *Halobacillus trueperi* RSK CAS9. *Biotechnol Reports*. 2015;8:64–71.

Schepky AG, Holtzmann U, Siegner R, Zirpins S, Schmucker R, Wenck H, Wittern KP, Biel SS. Influence of cleasing on stratum corneum tryptic enzyme in human skin. *International Journal of Cosmetic Science*. 2004;26:245–253.

Schmid A, Hollmann F, Park JB, Bühler B. The use of enzymes in the chemical industry in Europe. *Current Opinion in Biotechnology*. 2002;13(4):359–366.

Schrag JD, Li YG, Wu S, Cygler M. Ser-his-glu triad forms the catalytic site of the lipase from *Geotrichumcandidum*. *Nature*. 1991;351(6329):761–764.

Schrag, J.D.; Cygler, M. 1997. Lipases and αβ hydrolase fold. In : Byron Rubin, E.A.D., (Ed.). Methods in Enzymology: Academic Press, 284, p. 85-107. ISBN: 0076-6879.

Shabbiri K, Adnan A, Jamil S, Ahmad W, Noor B, Rafique HM. Medium optimization of protease production by Brevibacterium linens DSM 20158, using statistical approach. *Braz J Microbiol*. 2012;43(3):1051–1061.

Shafiei M, Ziaee A, Amoozegar MA. Purification and characterization of an organic-solvent-tolerant halophilic α-amylase from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 2011;38:275–281.

Shafiei M, Ziaee A, Amoozegar MA. Purification and characterization of an organic-solvent-tolerant halophilic α-amylase from the moderately halophilic *Nesterenkonia* sp. strain F. *Journal of Industrial Microbiolology and Biotechnolology*. 2011;38:275–281.

Shannon JC, Garwood DL, Boyer CD. Genetics and physiology of starch development. In: Bemiller J, Whistler R, eds. *Starch – Chemistry and Technology*. New York: Academic Press; 2009.

Shariff, F.M.; Leow, T.C.; Mukred, A.D.; Salleh, A.B.; Basri, M.; Rahman, R.N.Z.R.A. 2007. Production of L2 lipase by *Bacillus* sp. strain L2: Nutritional and physical factors. Journal of Microbiology and Biotechnology, 47: 406-12.

Sharma A, Satyanarayana T. Microbial acid-stable α-amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. *Process Biochemistry*. 2013;48(2):201–211.

Sharma A, Satyanarayana T. Microbial acid-stable α-amylases: Characteristics, genetic engineering and applications. *Process Biochemistry*. 2013;48(2):201–211.

Sharma R, Chisti Y, Banerjee UC. Production, purification, characterization, and applications of lipases. *Biotechnology Advances*. 2001;19(8):627–662.

Shieh CJ, Liao HF, Lee CC. Optimization of lipase-catalyzed biodiesel by response surface methodology. *Bioresource Technology*. 2003;88(2):103–106.

Siddiqui KS, Feller G, D'Amico S, Gerday C, Giaquinto L, Cavicchioli R. The active site is the least stable structure in the unfolding pathway of a multidomain cold-adapted alpha-amylase. *J Bacteriol*. 2005;187(17):6197–6205.

Sivaramakrishnan S, Gangadharan D, Nampoothiri KM, Soccol CR, Pandey A. Amylases from microbial sources - An overview on recent developments. *Food Technology and Biotechnology*. 2006;44(2):173–184.

Soares LHB, Assmann F, Ayub MAZ. Production of transglutaminase from *Bacillus circulans* on solid state and submerged cultivations. *Biotechnol Lett*. 2003;25:2029–2033.

Soeda T. Effects of microbial transglutaminase for gelation of soy protein isolates during cell storage. *Food Sci Technol Res*. 2003;9:145–149.

Son ES, Kim JI. Purification and characterization of caseinolytic extracellular protease from *Bacillus amyloliquefaciens* S94. *The Journal of Microbiology*. 2002;40:26–32.

Souza DT, Bispo ASR, Bon EPS, Coelho RRR, Nascimento RP. Production of thermophilic endo-b-1,4-xylanases by *Aspergillus fumigatus* FBSPE-05 using agro-industrial by-products. *Appl Biochem Biotechnol*. 2012;166:1575–1585.

Souza PM, Magalhães PO. Application of microbial alfa-amylase in industry – a review. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2010;41(1):850–861.

Souza PM, Bittencourt MLA, Caprara CC, Freitas M, Almeida RPC, Silveira D, Fonseca YM, Filho EXF, Pessoa Junior A, Magalhães PO. A biotechnology perspective of fungal proteases. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2015;46(2):337–346.

Sun H, Zhao P, Ge X, Xia Y, Hao Z, Liu J, Peng M. Recent advances in microbial raw starch degrading enzymes. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010;160(4):988–1003.

Tavernari FC, Carvalho TA, Assis AP, Lima HJD. Níveis de inclusão da torta de babaçu em rações de frangos de corte na fase inicial. *Rev Eletr Nutrime*. 2008;5:673–689.

Taylor MM, Bumanlag L, Marmer WN. Use of enzymatically modified gelatin and casein as fillers in leather processing. *J Am Leather Chem Assoc*. 2006;101:169–178.

Thomsen MH, Holm-Nielsen JB, Oleskowicz-Popiel P, Thomsen AB. Pretreatment of wholecrop harvested, ensiled maize for ethanol production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2008;148(1–3):23–33.

Tomazic SJ, Klibanov AM. Why is one Bacillus alpha-amylase more resistant against irreversible thermoinactivation than another? *J Biol Chem*. 2003;263:3092–3096.

Touioui SB, Jaouadi NZ, Boudjella H, Ferradji FZ, Belhoul M, Rekik H, Badis A, Bejar S, Jaouadi B. Purification and biochemical characterization of two detergent-stable serine alkaline proteases from Streptomyces sp. strain AH4. *World J Microbiol Biotechnol*. 2015;31(7):1079–1092.

Tripathi R, Singh J, Bharti RK, Thakur IS. Isolation. *Purification and Characterization of Lipase from Microbacterium sp. and its Application in Biodiesel Production. Energy Procedia*. 2014;54:518–529.

Turner P, Mamo G, Karlsson EN. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in biorefining. *Microb Cell Fact*. 2007;6:1–23.

Uyar F, Porsuk I, Kizil G, Yilmaz EI. Optimal conditions for production of extracellular protease from newly isolated *Bacillus cereus* strain CA15. *Eur Asian Journal of BioSciences*. 2011;5:1–9.

Vaidya S, Srivastava PK, Rathore P, Pandey AK. Amykases: A Prospective enzyme in the field of biotechnology soumya. *J Appl Biosci*. 2015;41(1):1–18.

Van der Maarel MJ, van der Veen B, Uitdehaag JC, Leemhuis H, Dijkhuizen L. Properties and applications of starch-converting enzymes of the alpha-amylase family. *Journal of Biotechnology*. 2002;94(2):137–155.

Veiga F, Pecorelli C, Ribeiro L. *As ciclodextrinas em tecnologia farmacêutica*. Coimbra: Minerva Coimbra; 2006.

Verger R. Interfacial activation of lipases: Facts and artifacts. *Trends in Biotechnology*. 1997;15(1):32–38.

Verma A, Ansari MW, Anwar MS, Agrawal R, Agrawal S. Alkaline protease from *Thermoactinomyces* sp. RS1 mitigates industrial pollution. *Protoplasma*. 2014;251(3):711–718.

Vermelho, A.B.; Damaso, M.C.T.; Valadão, R.C.; Couri, S. 2013. In: Methods to Determine Enzymatic Activity. Bentham & books editors Alane B. Vermelho, Sonia Couri. doi:10.2174/97816080530011130101. ISBN: 978-1-60805-300-1.

Vermelho, A.B.; Melo, A.C.N.; Branquinha, M.H.; Santos, A.L.S.; D'Ávila-Levy; Couri, S.; Bon, E.P.S. 2008. Enzimas proteolíticas: Aplicações Biotecnológicas. In: Enzimas em biotecnologia. Rio de Janeiro: Editora Interciência.

Vermelho, A.B.; Noronha, E.F.; Filho, E.X.; Ferrara, M.A; Bon, E.P.S. 2013. Prokaryotic Enzymes: Diversity and Biotechnological Applications. In : Rosenberg, E., Deelong, E.F., Lory, S., editors. The Prokaryotes. Heidelberg: Springer-Verlag. doi:10.1007/978-3-642-31331-8_112.

Vishwanatha KS, Appu Rao AG, Singh SA. Production and characterization of a milk-clotting enzyme from *Aspergillus oryzae* MTCC 5341. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2010;85:1849–1859.

Wahab RA, Basri M, Zaliha RN, Rahman RA, Salleh AB, Rahman MBA, Leow TC. Development of a catalytically stable and efficient lipase through an increase in hydrophobicity of the oxyanion residue. *J Mol Catal B-Enzym*. 2015;122:282–288.

Wang D, Ni K, Ren Y, Wei D. Site-directed modification of genetically engineered *Proteus* sp. lipase K107 variants with a polyethylene glycol derivative. *J Mol*

Catal B-Enzym. 2015;111:36–42.

Wang L, Cheng G, Ren Y, Dai Z, Zhao ZS, Liu F, Li S, Wei Y, Xiong J, Tang XF, Tang B. Degradation of intact chicken feathers by *Thermoactinomyces* sp. CDF and characterization of its keratinolytic protease. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2015;99(9):3949–3959.

Wang S, Chenb Y, Wangc C, Yenb Y, Chern M. Purification and characterization of a serine protease extracellularly produced by *Aspergillus fumigatus* in a shrimp and crab shell powder medium. *Enzyme and Microbial Technology*. 2005;36:5–6.

Wang, Z.; Sun, L.; Cheng, J.; Liu, C.; Tang, X.; Zhang, H.; Liu, Y. 2015. The optimization of fermentation conditions and enzyme properties of *Stenotrophomonas maltophilia* for protease production. Biotechnol Appl Biochem. doi:10.1002/bab.1361.

Watanabe K. Effective use of heterologous hosts for characterization of biosynthetic enzymes allows production of natural products and promotes new natural product discovery. *Chem Pharm Bull*. 2014;62(12):1153–1165.

Winkler FK, Darcy A, Hunziker W. Structure of human pancreatic lipase. *Nature*. 1990;343(6260):771–774.

Wishard R, Jaiswal M, Parveda M, Amareshwari P, Bhadoriya SS, Rathore P, Yadav M, Nayarisseri A, Nair AS. Identification and characterization of alkaline protease producing *Bacillus firmus* species EMBS023 by 16S rRNA gene sequencing. *Interdiscip Sci*. 2014;6(4):271–278.

Wishard R, Jaiswal M, Parveda M, Amareshwari P, Bhadoriya SS, Rathore P, Yadav M, Nayarisseri A, Nair AS. Identification and characterization of alkaline protease producing *Bacillus firmus* species EMBS023 by 16S rRNA gene sequencing. *Interdiscip Sci*. 2014;6(4):271–278.

Wu, S.; Liu, G.; Zhang, D.; Li, C.; Sun, C. 2015. Purification and biochemical characterization of an alkaline protease from marine bacteria *Pseudoalteromonas.* J Basic Microbiol sp. 129-1. doi:10.1002/jobm.201500327.

Yao G, Li Z, Gao L, Wu R, Kan R, Liu G, Qu Y. Redesigning the regulatory pathway to enhance cellulase production in *Penicillium oxalicum*. *Biotechnology for Biofuels*. 2015;8:71.

Yasueda H, Kumazawa Y, Motoki M. Purification and characterization of a tissue-type transglutaminase from red sea bream (*Pagrus major*). *Biosci Biotech Biochem*. 1994;1994:2041–2045.

Yin S, Zhou H, Xiao X, Lang T, Liang J, Wang C. Improving 2-phenylethanol production via ehrlich pathwayusing genetic engineered *Saccharomyces cerevisiae*strains. *Curr Microbiol*. 2015;70:762–767.

Yokoyama K, Nio N, Kikuchi Y. Properties and applications of microbial transglutaminase. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004;64:447–454.

Yossana S, Reungsang A, Yasuda M. Purification and characterization of alkaline protease from *Bacillus megaterium* isolated from thai fish. *Scienceasia*. 2006;32:1513–1874.

Yüksel Z, Erdem YK. The influence of transglutaminase treatment on functional proteins of set yogurt. *International Journal of Dairy Technology*. 2010;63:86–97.

Zeeman SC, Kossmann J, Smith AM. Starch: its metabolism, evolution, and biotechnological modification in plants. *Annu Rev Plant Biol*. 2010;61:209–234.

Zhang SC, Sun M, Li T, Wang QH, Hao JH, Han Y, Hu XJ, Zhou M, Lin SX. Structure analysis of a new psychrophilic marine protease. *PLoS One*. 2011;6(11).

Zhang YHP, Lynd LR. Determination of the number average degree of polymerization of cellodextrins and cellulose with application to enzymatic hydrolysis. *Biomacromolecules*. 2005;6:1510–1515.

Zhu Y, Tramper J. Novel applications for microbial transglutaminase beyond food processing. *Trends in Biotechnology*. 2008;26:10.

CAPÍTULO 10

Produção de Etanol Combustível

Nei Pereira Junior

Luiz Felipe Amarante Modesto

Johanna Méndez Arias

Carolina Araújo Barcelos

Maria Antonieta Peixoto Gimenes Couto

Conceitos apresentados neste capítulo

Neste capítulo, são apresentados os principais aspectos relativos à produção de etanol, seja de primeira (1G), segunda (2G) ou terceira (3G) gerações, conceitos elucidados e discutidos ao longo do texto.

Aspectos gerais da fermentação alcoólica são apresentados como forma de contextualizar a temática e esclarecer o leitor sobre a estrutura de produção do etanol. Ao longo do texto são mencionadas as etapas de processamento da matéria-prima, agentes biológicos que atuam nas diferentes etapas do processo e aspectos da bioquímica envolvida, enfatizando os principais fatores que exercem influência sobre o processo de fermentação e também as matérias-primas e insumos utilizados. Detalhada descrição sobre as diferentes estratégias e concepções de processo são apresentadas. Ao final, são apontadas perspectivas para o futuro do setor alcooleiro no país.

10.1. Introdução

Ao longo do século passado, as fontes fósseis de matérias-primas foram a base para o desenvolvimento da sociedade industrializada. Logo, as pesquisas científicas se concentraram no desenvolvimento de processos e refinarias baseados nestes recursos não renováveis — petróleo, carvão mineral e gás natural, principalmente — para a produção de uma ampla variedade de bens e produtos, tais como plásticos, fertilizantes, solventes, medicamentos, detergentes, combustíveis etc.

Com o passar do tempo, as fontes fósseis de matéria-prima se tornaram notoriamente presentes em todos os níveis de qualquer cadeia produtiva. Hoje em dia, muitas destas indústrias estão bem estabelecidas, contudo, em razão de uma maior preocupação por parte da sociedade em relação às questões ambientais, econômicas e ecológicas, a dependência em relação a estas fontes tradicionais de matérias-primas tem sido questionada (Naik *et al.*, 2010). Portanto, o comportamento da economia mundial se tornou extremamente sensível a qualquer mudança em sua qualidade, preço, oferta ou demanda.

É inegável que a queima de combustíveis fósseis e a consequente emissão de gases, como o CO_2, na atmosfera estão diretamente relacionadas com o processo de aquecimento global verificado ao longo dos últimos anos. Assim sendo, as questões ambientais se transformaram em um vetor de mudanças, impulsionadas por uma sociedade cada vez mais atenta e preocupada.

O amadurecimento do conceito de sustentabilidade e sua incorporação aos modelos de avaliação de desenvolvimento criaram uma nova classe social mais atenta e preocupada com o futuro do planeta, a qual demanda, cada vez mais, formas alternativas de energia e de processos produtivos menos poluidores. Sendo assim, urge a necessidade de progresso sem, no entanto, abrir mão do desenvolvimento sustentável das nações.

Com base neste contexto, as fontes renováveis de matérias-primas despertaram interesse geral, pois se apresentam como uma interessante alternativa, capaz de reduzir os impactos causados pela exploração das fontes fósseis. Cabe ressaltar que, nesta nova tendência, as biomassas assumiram um papel central como complementares à matriz energética de muitos países, tendo em vista suas características naturais e a capacidade de gerar formas de energia menos impactantes ao meio ambiente.

A produção de biocombustíveis, obtidos a partir de biomassas vegetais, se tornou o centro das atividades de pesquisa, desenvolvimento e inovação em todo o mundo, pois permite compensar os impactos causados pelas emissões de gases na atmosfera a partir da incorporação dos mesmos por intermédio da fotossíntese dos próprios vegetais. Além disso, são capazes de promover benefícios sociais, como a criação de oportunidades de emprego e de fixação de mão-de-obra no campo.

Mesmo sendo o etanol um biocombustível cuja utilização já é há tempos bem estabelecida em diferentes matrizes energéticas ao redor do planeta, foi no contexto da sustentabilidade que ele ganhou grande importância, tendo como exemplo a

experiência pioneira do Brasil na sua produção em larga escala, bem como a sua incorporação na matriz energética de origem fóssil. Esta foi, indubitavelmente, uma mudança radical de paradigma, pois se associou duas fontes de matérias-primas divergentes, incorporando renovabilidade à matriz energética fóssil.

10.2. Fermentação alcoólica

A etapa de fermentação constitui o cerne do processo de produção de etanol, uma vez que, neste estágio, ocorre a conversão efetiva dos materiais previamente tratados por álcool etílico, empregando como agentes fermentativos leveduras ou outros microrganismos capazes de produzir este biocombustível (Cardona *et al.*, 2010).

10.2.1. Bioquímica do processo

Os processos fermentativos para a produção de etanol ocorrem através da transformação de açúcares por agentes microbianos diversos, especialmente fungos e bactérias. Em geral, os processos industriais se utilizam de leveduras do gênero *Saccharomyces.*

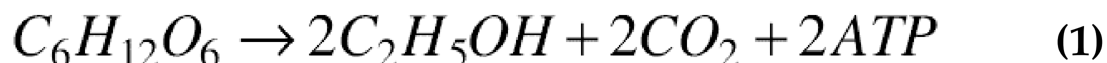
A fermentação de glicose (Figura 10.1), no caso da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, ocorre sob condições de elevadas concentrações de substrato e em anaerobiose, com um pequeno rendimento de biomassa formada por glicose consumida e elevadas conversões de substrato em etanol (Pereira Jr. *et al.*, 2008).

Glicose-6-fosfato
1
Frutose-6-fosfato
2
Frutose-1,6-difosfato
3
Dihidroxicetona Fosfato
4
Gliceraldeído-3-fosfato
12
NADH
NAD+
5
NAD^+
NADH
Glicerol-3-fosfato
1,3-Fosfoglicerato
13
Pi
6
ADP
ATP
Glicerol
3-Fosfoglicerato
7
2-Fosfoglicerato
8
ATP ADP
Piruvato
9
Fosfoenolpiruvato
10
CO_2
Acetaldeído
11
NAD+
NADH
Etanol

1-Fosfoglucose Isomerase; 2-Fosfofrutoquinase; 3-Aldolase; 4-Triose Fosfato Isomerase; 5-Gliceraldeído-3-Fosfato Desidrogenase; 6-Fosfoglicerato Quinase; 7-Fosfoglicerase Mutase; 8-Enolase; 9-Quinase Pirúvica; 10-Piruvato Descarboxilase; 11-Desidrogenase Alcoólica; 12-Glicerol-3-fosfato Desidrogenase; 13-α-glicerofosfatase

FIGURA 10.1 **Rota metabólica da fermentação alcoólica de glicose.** *Fonte*: Adaptado de Barcelos (2012).

A degradação completa da molécula de glicose leva à formação de etanol e dióxido de carbono, com a geração de 2 moléculas de ATP, conforme expresso na Equação 1 (Pereira Jr. *et al.*, 2008):



$$C_6H_{12}O_6 \rightarrow 2C_2H_5OH + 2CO_2 + 2ATP \qquad \textbf{(1)}$$

Trata-se de uma equação global, pois ao longo do processo há uma sequência de reações enzimáticas envolvidas na via glicolítica – também denominada de Embden-Meyerhof-Parnas (EMP), que levam a conversão de glicose a piruvato, com subsequente descarboxilação a acetaldeído e redução deste a etanol. De acordo com a equação (1), para cada grama de glicose, teoricamente obtém-se 0,511 gramas de etanol.

A primeira etapa do processo é denominada de etapa de ativação, na qual são subsequentemente adicionados grupamentos fosfato à glicose e ao seu isômero (frutose), gerando frutose 1,6-bifosfato. No segundo estágio, ao contrário do primeiro, há a geração de energia mediante a formação de ATP, com a conversão da frutose 1,6-bifosfato em piruvato. Por sua vez, na terceira e última fase, em que não há qualquer geração de ATP, são produzidos CO_2 e etanol. Convém ressaltar que essas duas substâncias não são de valor para as células, sendo inclusive tóxicas e devendo, necessariamente, ser excretadas ou convertidas em produtos menos nocivos à atividade celular. Assim, para o microrganismo, a função desta etapa é a de regeneração de NAD^+, de forma a restabelecer o equilíbrio de cofatores nas células (Pereira Jr. *et al.*, 2008).

Tendo em vista a recente tendência de se utilizar biomassas de natureza lignocelulósica, cuja composição é bastante heterogênea em termos de carboidratos, se fez necessária a inclusão de determinados gêneros microbianos capazes de metabolizar não só hexoses como também pentoses, ou seja, açúcares com 6 e 5 átomos de carbono, respectivamente.

Nos processos de conversão de pentoses outras espécies de leveduras são utilizadas, devido à incapacidade metabólica natural de *Saccharomyces cerevisiae* em assimilar açúcares com 5 átomos de carbono (Matsushika *et al.*, 2009). Neste caso, leveduras como *Scheffersomyces stipitis, Scheffersomyces segobiensis, Candida shehatae, Pachysolen tannophilus* se apresentam como agentes metabolicamente capacitados (Jeffries, 2006).

Cabe ressaltar que existem gêneros bacterianos com mecanismos para a fermentação de pentoses, porém, quando comparados a essas leveduras, se mostram menos interessantes em termos de aplicações industriais, devido à baixa tolerância ao etanol e, em sua grande maioria, realizar heterofermentações, ou seja, produzir outras moléculas, reduzindo o rendimento em etanol. Muitas espécies bacterianas ainda apresentam maiores necessidades nutricionais quando comparadas às leveduras.

Leveduras capazes de usar xilose utilizam a via de EMP precedida por outra via metabólica denominada de pentoses-fosfato (Figura 10.2). Nesta via, a xilose é, inicialmente, convertida em xilitol e posteriormente em xilulose, por meio da ação das enzimas xilose redutase (XR), dependente do cofator NADPH e xilitol-desidrogenase (XDH), a qual depende do cofator NAD^+. No entanto, estas enzimas do catabolismo inicial de xilose, em leveduras produtoras de etanol, apresentam dupla especificidade para os cofatores reduzidos e oxidados, com diferentes extensões. Desta forma, é possível aliviar o desbalanceamento do potencial redox na célula, permitindo que a fermentação alcoólica de xilose ocorra com baixas tensões de oxigênio. Uma vez fosforilada pela enzima xilulose-quinase (XK), a

xilulose converte-se em xilulose 5-P, que é um importante intermediário da via das pentoses-fosfato (Jeffries *et al.*, 2007; Matsushika *et al.*, 2008; Webb e Lee, 1990). Esta via fornece outros intermediários que se conectam com a via de EMP, como o gliceraldeído 3-P e a frutose 6-P, que são lançados na via EMP e convertidos em piruvato que, em baixas tensões de oxigênio é descarboxilado, originando acetaldeído, que é reduzido gerando etanol. Já em aerobiose, o piruvato é metabolizado no ciclo dos ácidos tricarboxílicos (Krebs), com a consequente geração de ATP na cadeia respiratória (Brüinenberg *et al.*, 1984; Matsushika *et al.*, 2008).

FUNGOS

BACTÉRIAS

D-Xilose

1

NAD(P)H

NAD(P)$^+$

Xilitol

2

NAD$^+$

NADH

D-Xilulose

3

ATP

ADP

D-Xilose

4

D-Xilulose

3

ATP

ADP

D-Xilose-5-Fosfato

Via das Pentoses

Reações não oxidativas conversão de pentoses fosfato em trioses e hexoses fosfato

Ciclo oxidativo (recuperação de NADPH)

Gliceraldeído-3P

Frutose-6P

Via Embden-Meyerhoff-Parnas

Aerobiose

Ciclo dos Ácidos Tricarboxílicos

Piruvato

NADH

NAD$^+$

Anaerobiose

Etanol + CO_2

Cadeia de transporte de Elétrons (regeneração de NAD$^+$ e ATP)

1 – Xilose Redutase (XR)

2 – Xilitol Desidrogenase (XDH)

3 – Xilulose Quinase (XK)

4 – Xilose Isomerase (XI)

FIGURA 10.2 **Via metabólica de D-xilose em bactérias e leveduras.** *Fonte*: Adaptado de Parajó *et al.* (1998a).

No caso de bactérias assimiladoras de pentoses, a bioquímica é ligeiramente distinta, uma vez que há conversão direta da xilose em xilulose, sob ação da enzima xilose isomerase (XI), a qual, por intermédio da xilulose-quinase, é convertida a xilulose 5-P, que, por conseguinte, é metabolizada na via das pentoses-fosfato (Hahn-Hägerdal e Palment, 2004; Margeot *et al*. 2009).

Assim, tem-se a Equação 2 global para descrever a conversão de xilose em etanol:



$$3C_5H_{10}O_5 \rightarrow 5C_2H_5OH + 5CO_2 \qquad \textbf{(2)}$$

Desta forma, teoricamente, 3 mols de xilose podem dar origem a 5 mols de etanol, ou seja, para cada grama de xilose consumida produz-se 0,511 g de etanol. No entanto, este rendimento não é possível de ser alcançado, tendo em vista que, além do substrato destinado à produção do etanol, parte deste importante componente do meio de fermentação é destinada ao crescimento, manutenção celular, formação de subprodutos e ao próprio transporte da pentose através da membrana celular (Girio *et al.*, 2010).

Com objetivo de se realizar uma fermentação eficiente de xilose e glicose, duas abordagens têm norteado pesquisas na área: a construção de microrganismos recombinantes dotados de capacidade para fermentar xilose, por meio da inserção de genes que codificam para o transporte e metabolismo deste açúcar, e a aplicação de técnicas da biologia molecular em microrganismos já capazes de fermentar naturalmente hexoses e pentoses, buscando um maior rendimento e tolerância em etanol (Pereira Jr. *et al.*, 2008).

Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* têm sido alvo de modificações genéticas com intuito de se implementar o metabolismo cofermentativo de xilose e glicose, por meio da inserção dos genes XYL1 e XYL2 de *Scheffersomyces stipitis* (responsáveis pela codificação das enzimas XR NADPH-dependente e XDH NAD^+-dependente) ou por meio de melhorias na expressão da enzima xilulose-quinase (Jeffries e Jin, 2004), permitindo, assim, a conversão da xilose em xilulose 5-P, intermediário fundamental da via das pentoses-fosfato, conforme já salientado anteriormente (Pereira Jr. *et al.*, 2008).

10.2.2. Principais fatores de influência na fermentação alcoólica

Durante o processo de fermentação, as condições do meio reacional se alteram, submetendo o microrganismo a diversos tipos de estresse, com consequências para as estruturas da célula que podem sofrer alterações, comprometendo o seu bom funcionamento. Como resposta, os microrganismos sintetizam moléculas com o objetivo de reparar os danos provenientes desta situação (Barcelos, 2012; Folch-Mallol *et al.*, 2004; Ruis e Schüller, 1995).

Entre os possíveis fatores de estresse celular, pode-se citar os de ordem oxidativa, os osmóticos, os iônicos e aqueles relacionados com elevações de temperatura e limitações por nutrição (Barcelos, 2012; Querol *et al.*, 2003). Fatores como temperatura, pH, teor de oxigênio, concentrações de substrato e produto exercem influência sobre as taxas de crescimento celular, de fermentação e de consumo de açúcar, bem como sobre a viabilidade celular (Lin *et al.*, 2012). A seguir, alguns destes fatores são discutidos para o caso das leveduras *Saccharomyces cerevisiae*, a espécie mais empregada industrialmente para a produção de etanol.

Temperatura

Não obstante a taxa inicial de formação de etanol ser maior em temperaturas próximas a 40°C, observa-se uma queda na produtividade global em virtude da inibição por produto, acentuada em temperaturas elevadas. Assim, a temperatura

usual para uma fermentação alcoólica eficiente situa-se na faixa de 28 a 35°C (Barcelos, 2012; Roehr, 2001). Estudos já indicaram capacidade de produção de etanol por *Saccharomyces cerevisiae* em temperatura de 45°C; no entanto, a 50°C ocorre interrupção do processo (Lin *et al.*, 2012). Para temperaturas de 36°C e 39°C foi reportado um grande aumento na formação de glicerol, um soluto compatível (Aldiguier *et al.*, 2004).

pH

O pH ótimo para a produção de etanol situa-se, geralmente, na faixa de 4 a 5. Para valores de pH superiores a 5 são reportados decréscimos na produção de etanol. Na faixa de 5 a 6, há um aumento na formação de butirato, enquanto, para valores inferiores a 4, ocorre uma maior geração de ácido acético (Lin *et al.*, 2012).

Concentração de oxigênio dissolvido

A concentração de oxigênio dissolvido é um parâmetro fundamental em qualquer processo de produção de etanol. Sua disponibilidade no meio de fermentação afeta a viabilidade celular, a produção de ácidos graxos, o crescimento celular e o metabolismo de glicose. Os efeitos *Pasteur* – inibição da via glicolítica na presença de excesso de oxigênio – e *Crabtree* – favorecimento da fermentação em meios com elevadas concentrações de glicose, mesmo na presença de oxigênio – são clássicos exemplos da relevância deste fator no processo (Grosz e Stephanopoulos, 1990).

A aeração ainda é responsável por influenciar na formação de subprodutos, a exemplo do glicerol. A presença de oxigênio em baixas concentrações se mostra capaz de reduzir a produção deste composto, o que traz importantes implicações nas etapas de *downstream* para recuperação do etanol (Alfenore *et al.*, 2004).

Densidade celular, concentrações de substrato e produto

Elevadas concentrações de substrato exercem efeito inibitório sobre as células de *Saccharomyces*, embora algumas espécies possuam maior tolerância do que outras (Tuite e Oliver, 1991). Por sua vez, para concentrações de etanol superiores a 80 g/L ocorre redução significativa nas taxas de fermentação (Girio *et al.*, 2010) e de crescimento celular, ocasionando até mesmo a morte dos microrganismos.

Esta inibição é consequência do efeito exercido pelo etanol sobre a membrana plasmática e sobre as enzimas envolvidas na primeira etapa da glicólise, particularmente as hexoquinases (Baeyens *et al.*, 2015; Nagodawithana *et al.*, 1976; Karsch *et al.*, 1983). Uma das formas de contornar esses obstáculos é mediante o emprego de altas densidades celulares, minimizando os efeitos inibitórios do substrato e do produto, levando a uma redução no tempo de fermentação (Riesenberg e Guthke, 1999).

10.3. Matérias-primas para produção de etanol

Há uma série de matérias-primas que contém substratos passíveis de utilização na produção de etanol, os quais podem ser classificados como:

Substratos solúveis: são exemplos a sacarose, a glicose, a frutose e a lactose, que podem ser facilmente extraídos de matérias-primas como a cana-de-açúcar, beterraba, melaço, soro de leite, entre outros (Figura 10.3). De uma forma geral as biomassas sacaríneas demandam etapas relativamente simples de beneficiamento, por outro lado, à exceção dos melaços, são matérias-primas de alta perecibilidade, tendo em vista que os açúcares livres estão diretamente disponíveis para a metabolização por células microbianas (Barcelos *et al.*, 2014).

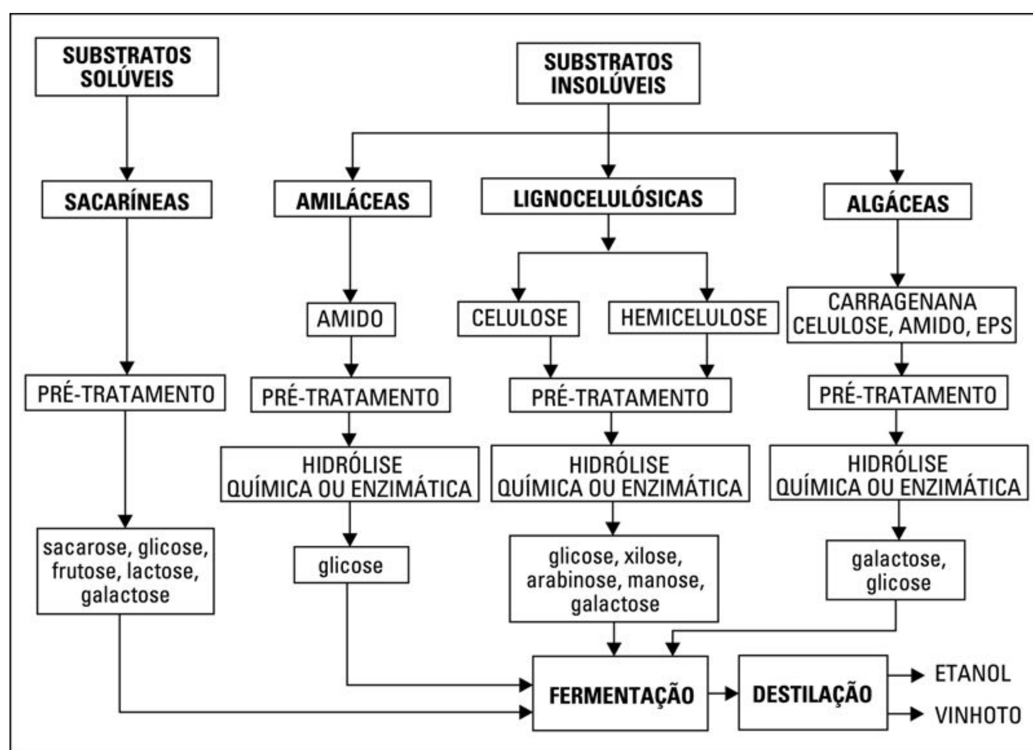


FIGURA 10.3 Matérias-primas para produção de etanol. *Fonte*: Adaptado de Pereira Jr. (1991).

Substratos insolúveis: encontrados na forma de polissacarídeos, havendo a necessidade de pré-tratamento e hidrólise para liberação dos seus monômeros (Figura 10.3). De acordo com sua origem, podem ser agrupados em:

a) **Polissacarídeos presentes em material amiláceo:** obtidos de milho, mandioca, arroz, trigo, cevada, batata e outros (Barcelos *et al.*, 2014). Neste caso, previamente à fermentação, é requerida uma etapa de hidrólise para a obtenção de açúcares fermentáveis, por exemplo, glicose e maltose. No entanto, há uma vantagem do ponto de vista logístico, uma vez que o tempo

de estocagem é maior, especialmente no caso de grãos, em comparação às biomassas sacaríneas.

b) **Polissacarídeos presentes em materiais lignocelulósicos:** são oriundos de biomassas vegetais, geralmente sob a forma de resíduos provenientes das atividades agrícolas (palhas de cana, de trigo, de arroz, entre outras), florestais (raspas de madeiras) e agroindustriais — bagaço de cana, bagaço de sorgo, cascas de arroz e resíduos da fabricação de papel e celulose (Pereira Jr. *et al.*, 2008). Também são requeridas etapas de pré-tratamentos para desconstrução do complexo lignocelulósico, seguidas de hidrólise dos principais polissacarídeos (celulose e hemicelulose) para disponibilização dos açúcares que serão fermentados a etanol.

c) **Polissacarídeos presentes em algas:** dentre as algas existentes nos mares e oceanos destacam-se as macroalgas de três filos: *Phaeophyta* (algas pardas ou marrons), *Chlorophyta* (algas verdes) e *Rhodophyta* (algas vermelhas) que possuem teores expressivos de carragenana, laminarina, celulose e amido (Chan *et al.*, 2006; Rajkumar *et al.*, 2014). Outro grupo importante que pode servir como matéria-prima para a produção de etanol de forma integrada inclui as microalgas como *Chlorella, Chlamydomonas, Dunaliella, Scenedesmus* e *Tetraselmis*, com capacidade para acumular polissacarídeos. Devido à grande heterogeneidade desses micro-organismos, a composição dos polissacarídeos das microalgas tem acentuadas diferenças entre espécies e classes. Glicose é a principal unidade monossacarídica encontrada, enquanto ramnose, fucose, ribose, arabinose, xilose, manose e galactose são detectadas em variadas proporções (Brown, 1991; Brown *et al.*, 1997; Noraini *et al.*, 2014).

10.4. Etanol de primeira geração (1g): tecnologias maduras

Para a produção do etanol de primeira geração são utilizadas matérias-primas também denominadas de 1ª geração, que são aquelas com composições sacaríneas (açucaradas) e amiláceas. Brasil e EUA utilizam diferentes fontes de matérias-primas, como o caldo de cana-de-açúcar, no caso brasileiro, e amido extraído de milho, no caso norte-americano.

Esta distinção entre as fontes de matérias-primas é de extrema relevância na configuração dos processos produtivos, os quais diferem entre si, em virtude do grau de complexidade do substrato utilizado. Desta forma, ressaltam-se as diferenças entre os processos com base em sacarose ou amido, visto ser o amido um carboidrato mais complexo (ao contrário da sacarose), cujo processamento requer etapas adicionais que acarretam o aumento dos custos operacionais do processo produtivo que acaba sendo transferido para o preço do bioetanol (Barcelos *et al.*, 2014).

A seguir, serão abordados os processos produtivos de etanol a partir de diferentes fontes de matérias-primas, tanto sacaríneas quanto amiláceas, com destaque para a cana-de-açúcar, como amiláceos e suas principais peculiaridades.

10.4.1. Tecnologias de produção

10.4.1.1. Produção de etanol de cana-de-açúcar

A cana-de-açúcar é uma biomassa sacarínea, ou seja, apresenta em sua fração líquida um substrato com estrutura molecular simples – a sacarose – que compõe a reserva energética do vegetal. A sacarose, o dissacarídeo mais importante para a indústria de etanol no Brasil, é formada através da união de uma molécula de glicose com outra de frutose e é a molécula presente nas biomassas vegetais, de natureza sacarínea, mais comum. É sintetizada através do processo de fotossíntese, pelo qual o carbono 1 da glicose se liga ao carbono 2 da frutose através de ligação do tipo α-β (α-D-glucopiranosil-(1→2)-β-D-frutofuranose). Este carboidrato é encontrado em vegetais, principalmente naqueles que produzem frutos. Além disso, também pode ser armazenado em outras partes da planta, como em talos e colmos, a exemplo do sorgo sacarino e a cana-de-açúcar. No entanto, a cana-de-açúcar é considerada o vegetal que possui os mecanismos fisiológicos mais aperfeiçoados para a produção de sacarose, pois suas vias fotossíntéticas são mecanismos altamente eficientes, que o homem, através de melhorias continuadas, desenvolveu, até criar variedades comerciais com alto teor de sacarose e com maior resistência a pragas e às intempéries climáticas (Taupier e Rodriguez, 1999).

O processo de produção de etanol a partir da cana-de-açúcar é composto por diferentes operações, que são detalhadas na sequência (Figura 10.4).

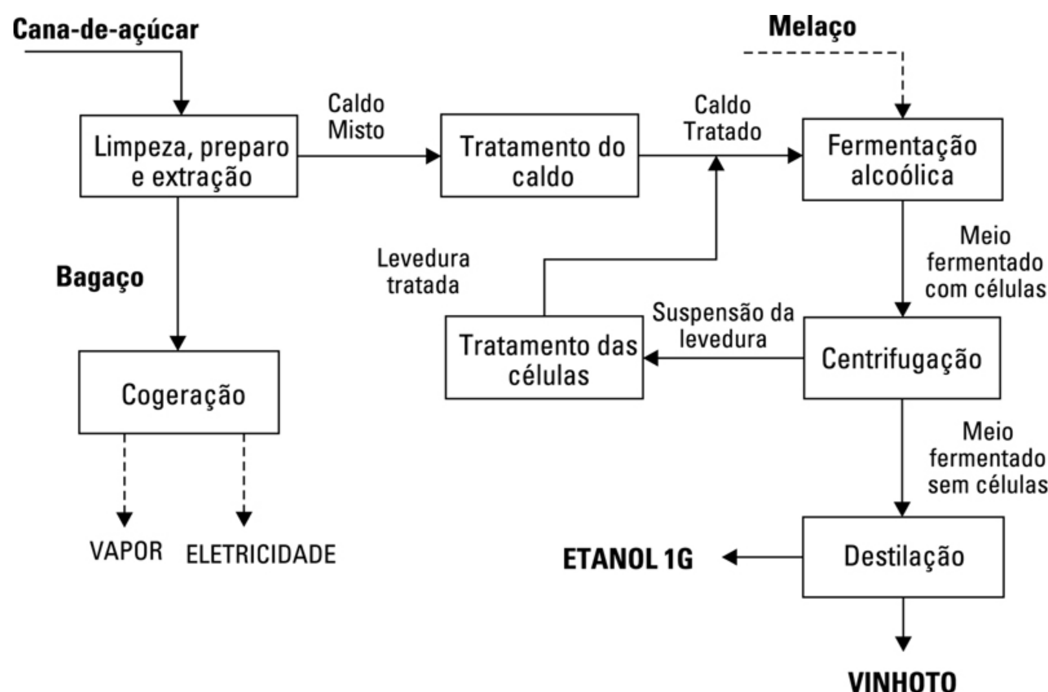


FIGURA 10.4 Diagrama da produção de etanol 1G a partir de caldo da cana. *Fonte*: Amorim (2005).

Pré-tratamentos

Após a colheita da cana, são realizadas operações de lavagem ou limpeza a seco, nas quais são eliminadas as impurezas trazidas do campo, seguidas de extração do caldo, através de moendas ou difusores. Na sequência, é realizado o tratamento do caldo para remoção de outras impurezas e possíveis contaminações para adequá-lo para a etapa de fermentação. Tais tratamentos são os seguintes:

- Peneiramento: empregando peneiras ou hidrociclones são separadas as partículas leves e pesadas, com o objetivo de evitar danos em bombas, prevenir incrustações em tubulações, entupimento de válvulas etc.
- Aquecimento: em tanques, o caldo é aquecido a 100-150°C para eliminar microrganismos contaminantes e reduzir a formação de espuma ao longo da etapa de fermentação. Nesta etapa, pode ser feita adição de cal (processo de calagem), ocorrendo a precipitação de gomas e outras impurezas.
- Decantação e filtração: Por ação da gravidade, busca-se a separação de impurezas associada a uma pequena perda de nutrientes. A parte decantada é denominada de lodo e é composta justamente pelas impurezas, que após filtração gera a torta e o caldo filtrado. A torta resultante é enviada ao canavial para ser utilizada como adubo e o caldo clarificado, por sua vez, é resfriado a 30°C.

Em destilarias anexas às usinas de produção de açúcar, pode haver diferenças significativas. Nas unidades conjugadas a maior parte do caldo é direcionada para a produção de açúcar, cujo tratamento tem que ser mais intensivo, requerendo operações adicionais como acidificação (sulfitação), adição de cal (calagem). Neste

caso, a produção de etanol utiliza como substrato um caldo residual, de menor concentração, que é misturado ao melaço oriundo da produção de açúcar.

Preparo do inóculo

O inóculo é definido como uma suspensão de microrganismos suficientemente concentrada que é adicionada ao caldo de cana para iniciar a fermentação propriamente dita. O preparo do inóculo se dá em meios com baixo teor de sacarose para evitar a repressão catabólica e os fermentadores devem receber aeração para que haja uma eficiente conversão de nutrientes em células. O crescimento celular é iniciado e, uma vez atingida a concentração celular desejada, inocula-se o caldo de fermentação com estas células previamente crescidas. Recomenda-se que a inoculação do caldo de fermentação aconteça na fase exponencial de crescimento, com uma cultura altamente ativa. O volume de inóculo a ser usado e sua concentração de leveduras definirão o tempo do processo fermentativo, já que a utilização de altas concentrações de células de levedura resulta em fermentações mais rápidas. De uma forma geral na indústria, o inóculo representa de 10-12% do volume do fermentador. Outro aspecto importante a ser ressaltado é o principal agente da fermentação alcoólica – células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* – ser um microrganismo facultativo para oxigênio, ou seja: em aerobiose, as leveduras se reproduzem intensamente, além de produzirem gás carbônico e água, podendo incorporar de 50-60% do carbono contido na molécula do substrato em massa celular. Por outro lado, em anaerobiose, ou fermentação, as leveduras produzem etanol e gás carbônico, além de apresentarem um pequeno crescimento (10-15% do carbono contido na molécula do substrato são incorporados à plasticidade celular) (Pereira Jr. *et al.*, 2008). Por essa razão, quando se deseja ativar o crescimento das leveduras, é recomendável o emprego de aeração.

Modos de operação da fermentação

A produção industrial de etanol pode ser operada continuamente ou por batelada alimentada. Na batelada alimentada, o substrato é adicionado ao fermentador, previamente inoculado, de forma contínua, sem que ocorra a retirada de material fermentado durante a operação. A flexibilidade oferecida por esta forma de operação é adequada a processos fermentativos em que o crescimento celular e/ou formação de produtos são significativamente sensíveis à concentração do substrato limitante, como é o caso da fermentação alcoólica. O meio contendo o substrato é alimentado em condições controladas até atingir o volume útil máximo do fermentador, permitindo o controle da concentração de substrato e minimizando os seus conhecidos efeitos de inibição sobre o metabolismo da levedura. Após o enchimento do fermentador, aguarda-se o esgotamento do substrato, quando se encaminha o meio fermentado (vinho) para a separação de células, sendo o meio isento de células, contendo o etanol em sua máxima concentração, enviado à seção de destilação, para a obtenção do etanol hidratado e/ou anidro.

A fermentação contínua é outra modalidade de se operar o processo. Como o próprio nome sugere, tanto a alimentação de meio de fermentação, quanto a

retirada de produto (meio fermentado) são realizadas de forma contínua. Sua principal vantagem, quando comparada com outras formas de operação, está ligada à possibilidade de se operar o sistema por extensos períodos de tempo, resultando em aumento de produtividade. A fermentação contínua pode ser conduzida com um único fermentador (com e sem reciclo de células) e com fermentadores em série. As seguintes vantagens da operação contínua podem ser apontadas: (i) inexistência de tempos improdutivos, levando o fermentador a permanecer muito mais tempo em serviço; (ii) as operações que antecedem e sucedem o processo podem ser realizadas continuamente, facilitando o controle automático, e, por conseguinte, levando a menores gastos com mão de obra; (iii) maior uniformidade do produto, tendo em vista a possibilidade de se estabelecer estado estacionário no fermentador; e (iv) menores custos de instalação e operação. No entanto, maiores riscos de contaminação bacteriana por não haver frequente limpeza dos fermentadores e problemas ligados à degenerescência do agente são citados como desvantagens da operação contínua, embora não sejam exclusivas desta modalidade de operação da fermentação alcoólica. A escolha entre a produção a partir do sistema de batelada alimentada ou contínuo é bastante polêmica, no entanto a batelada alimentada domina nas destilarias anexas e autônomas no país (Pereira Jr. *et al.*, 2008).

Separação e tratamento das células de levedura

Terminada a etapa de fermentação, há separação das leveduras no meio fermentado por meio de centrífugas. O concentrado celular obtido (leite levedurado) é enviado para tratamento com ácido sulfúrico concentrado, processo denominado de Melle-Boinot, ao passo que o meio fermentado isento de células é conduzido às colunas de destilação.

As células centrifugadas são tratadas com ácido sulfúrico com valores de pH variando entre 2,5 e 3,0 por 3 horas, em fermentadores menores, denominados de cubas de tratamento, onde também recebem nutrientes, água e agitação, revigorando as células antes de uma nova fermentação. Esta modalidade de operação de processo fermentativo tem a vantagem de não necessitar de propagação de células para o preparo do inóculo, com a consequente economia de matéria-prima que será utilizada mais efetivamente para a produção de etanol propriamente dita. Deve-se considerar ainda que o tratamento das células (fermento) possibilita a obtenção de um inóculo bastante uniforme que, estando presente em maior concentração, promoverá a degradação dos açúcares e a sua transformação em etanol de maneira mais eficiente (maior rendimento) e mais rápida (maior produtividade).

Separação do etanol

A etapa de separação do etanol, em geral, é realizada através de colunas de destilação em regime contínuo. Um sistema de destilação convencional pode ser composto por até quatro colunas, cada qual destinada a uma operação. Tais operações são conhecidas como Técnica de *Melle Guinot*, composta pelas seguintes etapas (Barcelos *et al.*, 2014):

1. Destilação: Etapa inicial em que o meio fermentado é aquecido e inserido em uma coluna contendo de 26 a 32 estágios. Ao final, o meio é concentrado em etanol em cerca de 50% e destinado à etapa de retificação.
2. Retificação: O meio que sai da coluna de destilação é encaminhado para uma segunda coluna, chamada de coluna retificadora, para elevar ainda mais sua concentração. Esta segunda coluna contém cerca de 55 estágios e o produto final é o álcool hidratado com concentração em torno de 95%, ou seja, a concentração do azeótropo etanol-água.
3. Desidratação: O sistema na concentração azeotrópica requer outros meios para que se possa produzir etanol com concentrações em torno de 99%, considerado álcool anidro. O método mais comum é a introdução de um terceiro componente, o qual é capaz de desfazer essa mistura azeotrópica, e o etanol é recuperado em uma terceira coluna com cerca de 42 estágios. No passado, utilizou-se benzeno, que teve que ser substituído e, hoje em dia, se utiliza o ciclohexano ou glicóis. Contudo, métodos mais modernos, como o uso de peneiras moleculares, vêm sendo empregados.
4. Recuperação dos agentes desidratantes: No caso de sistemas em que se utiliza ciclohexano ou glicóis, uma quarta coluna é utilizada para a recuperação destes compostos. O número de estágios depende do tipo de composto e sua concentração no meio, sendo que para o caso do ciclohexano é utilizada uma coluna com cerca de 40 estágios.

A Figura 10.4 ilustra de maneira sumária o processo de produção de etanol 1G.

O processo de destilação gera, ao final, um produto de fundo (efluente) em abundância denominado de vinhoto, ou vinhaça. Este efluente é composto por água e tudo o que foi produzido ao longo do processo fermentativo e separado do etanol no sistema de destilação, ou seja, é rico em matéria orgânica e sais, particularmente potássio. É gerado em uma proporção de 5-16 litros para cada litro de etanol produzido e vem sendo amplamente utilizado na fertirrigação nos canaviais brasileiros. Contudo, o intensivo emprego deste efluente pode ser danoso ao solo, aumentando sua acidez e, até mesmo, causando a sua eutrofização (Pereira *et al.*, 2009).

Os sistemas de produção de energia elétrica atualmente utilizados na indústria sucroalcooleira são sistemas com ciclos a vapor de água (de alta e de baixa pressão), com queima direta do bagaço de cana, e operando em regime de cogeração (Nova Cana, 2015). Isto tem permitido às indústrias do setor a autossuficiência em energia. No entanto, excedentes do bagaço de cana, bem como a possibilidade de se queimar a palha ou mesmo a lignina, contida em ambas as frações da cana (bagaço e palha), ao invés do bagaço integralmente, abrem oportunidades para a produção do etanol de segunda geração, que traz vários benefícios para o setor sucroalcooleiro, como detalhado na seção 10.5.

10.4.1.2. Produção de etanol a partir de matérias-primas amiláceas

O processo de produção de etanol de amido é similar ao processo fermentativo a partir de caldo de cana-de-açúcar. As principais diferenças estão nas etapas a montante do processo, que envolvem a hidrólise do amido.

O amido é a principal substância de reserva nas plantas superiores e fornece em torno de 80% de toda energia consumida pelo homem. É um homopolissacarídeo constituído por unidades de D-glicose e sua estrutura química é formada por duas frações polissacarídicas denominadas de amilose e amilopectina.

A amilose é um polissacarídeo formado essencialmente por moléculas de D-glicose unidas por ligações α(1-4) podendo apresentar um pequeno número de ramificações. A distribuição de massas molares também é função da fonte de origem, bem como da forma de extração, variando de 200 a 2.000 unidades monoméricas. Já a amilopectina é um polissacarídeo altamente ramificado e formado por centenas de cadeias curtas de unidades D-glicosídicas ligadas em α(1-4) e com ligações α(1-6) no ponto de ramificação (Buléon *et al.*, 1998; French, 1984; Lineback, 1984).

As matérias-primas amiláceas sofrem fermentação somente após a hidrólise do amido em açúcares fermentáveis, processo levado a cabo com o uso de enzimas amilolíticas. A hidrólise enzimática prévia se faz necessária, pois a grande totalidade das leveduras produtoras de etanol não é capaz de fermentar diretamente o amido, a menos que sofra manipulação genética. Os produtos finais do processo de hidrólise enzimática são: glicose, maltose e dextrinas (polissacarídeos de baixa massa molecular).

Hidrólise enzimática do amido

O amido apresenta ampla utilização industrial na sua forma nativa, porém cada vez mais vem sendo utilizado após modificações na sua estrutura. Tais modificações podem ser feitas por dois processos: biológico ou químico, sendo o primeiro a escolha de preferência por diversas razões: menor consumo de energia, pequena produção de compostos secundários, simplificação na linha de produção com reatores unitários de liquefação e sacarificação e principalmente a disponibilidade cada vez maior de enzimas amilolíticas (Surmely, 1997).

O aquecimento de suspensões de amido causa uma transição irreversível denominada gelatinização, que torna a molécula de amido mais exposta ao ataque das enzimas possibilitando uma reação mais eficiente (Hansen *et al.*, 2008). O inchamento irreversível dos grânulos e a concomitante solubilização da amilose e amilopectina induzem a gradual perda da integridade granular. Caso os grânulos continuem a se expandir, a amilose é lixiviada para a fase aquosa entre os grânulos. Este processo resulta em um aumento substancial da viscosidade (Cereda, 2001). A faixa de temperatura de gelatinização do amido é uma característica do genótipo da planta na qual o amido é sintetizado e é afetada pelas condições do meio, especialmente a temperatura durante o desenvolvimento do grânulo (Ellis *et al.*, 1998).

A etapa subsequente à gelatinização é denominada liquefação, que consiste na quebra limitada das ligações glicosídicas produzindo entre 15 e 30% de dextrinas.

A liquefação enzimática é realizada por endoamilases, como α-amilase (Kennedy *et al.*, 1988).

Em uma terceira etapa do processo de hidrólise enzimática do amido, ocorre a sacarificação, que é a hidrólise total das moléculas menores provenientes da liquefação em unidades de glicose. Esta reação é catalisada por uma exoamilase, como a glucoamilase, que irá retirar os resíduos de glicose a partir das extremidades da cadeia. O período de tratamento enzimático e a concentração de enzimas para a sacarificação do amido vão depender do tipo de hidrolisado que se pretende obter (Crabb e Mitchinson, 1997).

As enzimas amilolíticas são proteínas que constituem uma classe de hidrolases, responsáveis pela degradação do amido e seus derivados. Basicamente, há cinco grupos principais de enzimas do complexo amilolítico e a hidrólise do amido ocorre a partir da ação conjunta destas enzimas (Maldonado e Lopez, 1995):

- **Endoamilases:** atuam sobre as ligações α-1,4 internas na amilose e na amilopectina, porém não agem sobre ligações α-1,6. Sua ação provoca redução da viscosidade do material e gera oligossacarídeos com cadeias de tamanhos variáveis, denominadas maltodextrinas. Industrialmente, têm sido empregadas amilases termorresistentes, que catalisam a hidrólise simultaneamente ao cozimento. Uma enzima de destaque deste complexo é a α-amilase.
- **Exoamilases:** atuam sobre os mesmos substratos das endoamilases, mas de forma distinta. Sua ação se dá externamente, sobre os terminais não redutores, produzindo substâncias de baixa massa molar. Algumas destas enzimas são capazes de clivar ligações α-1,6, contudo, a taxas muito inferiores. A glucoamilase é uma relevante enzima deste grupo.
- **Isomerases:** são responsáveis pela conversão dos xaropes de glicose em xaropes de frutose. Apresentam grande aplicação na indústria de alimentos.
- **Desramificadoras:** agem exclusivamente nas ligações α-1,6. Fazem parte deste grupo as pululanases e as isolamilases.
- **Ciclodextrinas glicosiltransferases:** degradam o amido, catalisando reações de ciclização e desproporcionamento e formando ciclodextrinas.

As principais enzimas envolvidas na produção de etanol de material amiláceo são: α-amilase e glucoamilase. Os principais produtos da ação de α-amilase (E.C 3.2.1.1) são dextrinas de baixa massa molecular, maltotriose, maltose e glicose, dependendo da fonte da enzima. É uma enzima liquidificante porque reduz drasticamente a viscosidade da solução de amido (Nakafi e Deobagkar, 2005; Uhlig, 1998; Baysal *et al.*, 2008). A Figura 10.5 apresenta o mecanismo de degradação prolongada dos componentes do amido pela ação da α-amilase.

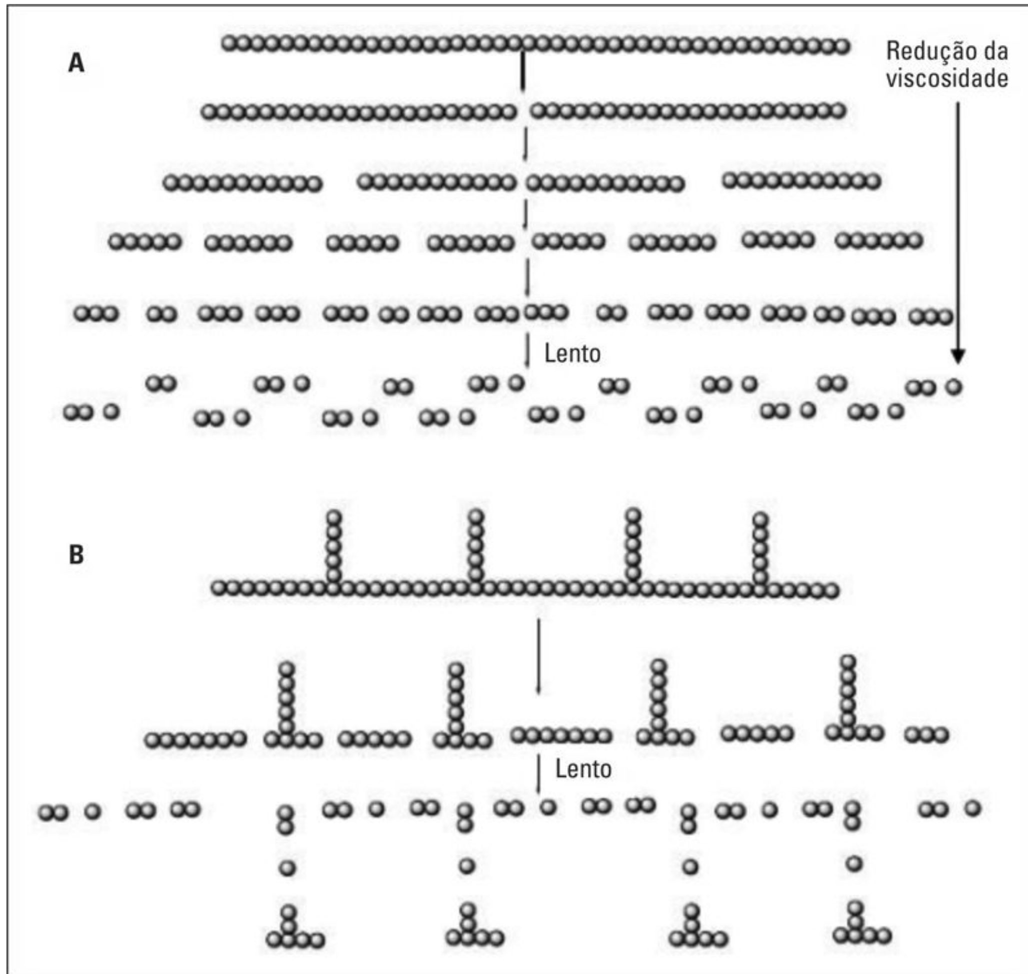


FIGURA 10.5 Mecanismo de ação da α-amilase sobre os componentes do amido. A. Amilose. B. Amilopectina. *Fonte: Mousdale (2008).*

A glucoamilase (E.C 3.2.1.3) é uma enzima liquidificante e sacarificante, que ataca as ligações (1→4) a partir das extremidades não redutoras liberando moléculas de D-glicose. A hidrólise ocorre também nas ligações (1→6), mas em proporção menor do que a que ocorre nas ligações (1→4) (Gangadharan *et al.*, 2008; Liu, 2002; Wang *et al.*, 2008). A Figura 10.6 apresenta o mecanismo de degradação da amilose e amilopectina pela ação da glucoamilase.

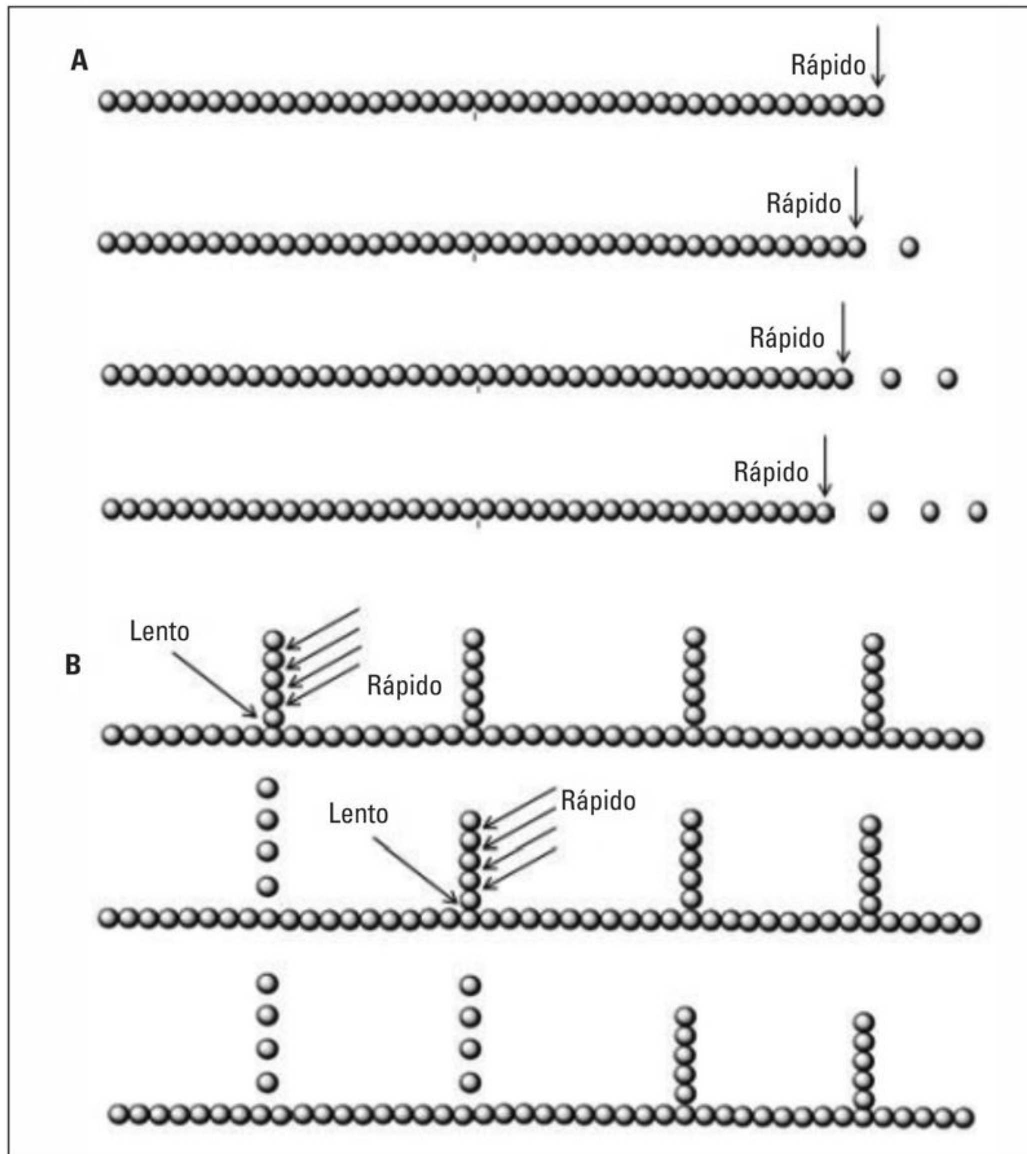


FIGURA 10.6 Mecanismo de ação da glucoamilase sobre os componentes do amido. A. Amilose. B. Amilopectina. *Fonte*: Gangadharan *et al.* (2008); Liu (2002) e Wang *et al.* (2008).

A ação de enzimas amilolíticas sobre grânulos de amido tem sido estudada e os amidos classificados em função da susceptibilidade. Em ordem crescente de susceptibilidade são citados os amidos de milho ceroso, mandioca, sorgo ceroso, sorgo, milho, arroz, sagu, araruta e batata (Leach e Schoch, 1961).

Após a hidrólise enzimática do amido, dá-se início ao resfriamento e então a levedura e outros nutrientes são adicionados para o início do processo fermentativo. O meio fermentado é enviado à unidade de destilação onde se separa no topo da coluna a mistura álcool/água de uma fração aquosa contendo sólidos solúveis e insolúveis, denominada de vinhaça, que se retira pelo fundo. A eliminação da água e das impurezas do álcool efetua-se mediante um processo de retificação, onde se obtém um álcool concentrado que, finalmente, é desidratado até

alcançar valores superiores a 99,75%, etapa semelhante à do etanol de caldo de cana. As vinhaças são enviadas a máquinas centrífugas chamadas decantadores, que separam a maioria dos sólidos em suspensão (fibra, celulose etc.) dos sólidos dissolvidos (açúcares residuais e proteínas solúveis). Desse modo, se obtém uma torta de sólido úmido que é enviada, junto com o xarope obtido da evaporação, à unidade de secagem. O produto seco (DDGS – Dried Distiller's Grains with Solubles – torta residual de grãos secos de destilaria) é enviado para a seção de peletização, onde se obtém o DDGS em *pellets*, que, de acordo com o seu nome, é um composto proteico utilizado como alimento animal.

10.5. Etanol de segunda geração (etanol 2g): tecnologias emergentes

O etanol obtido a partir de biomassa lignocelulósica é denominado etanol de segunda geração (etanol 2G), cuja produção surge como uma alternativa para se incrementar a produção deste biocombustível sem a necessidade de se expandirem as fronteiras agrícolas (Chandel *et al.*, 2014), uma vez que as biomassas lignocelulósicas são, usualmente, resíduos da atividade agroindustrial, dos setores sucroalcooleiro, de alimentos e florestal.

Os materiais lignocelulósicos constituem uma valiosa fonte de matéria-prima renovável para a obtenção de bioprodutos como o etanol (Pereira Jr. *et al.*, 2008), processo inserido no conceito de biorrefinaria[1].

A parede celular da biomassa vegetal é tipicamente formada por celulose, hemicelulose e lignina. A proporção dos componentes principais na biomassa lignocelulósica é variável entre 25%-55% de celulose, 8%-25% de hemicelulose e 10%-35% de lignina (Kapoor *et al.*, 2014). Os teores desses principais componentes dependem de origem, idade, fase do crescimento, entre outros, e podem apresentar variações inclusive dentro de um mesmo tipo de planta (Quiroz *et al.*, 2015).

A lignina, uma macromolécula amorfa e tridimensional, é formada principalmente de álcoois aromáticos e é responsável por fornecer suporte estrutural, reforço mecânico, impermeabilidade e resistência à digestão enzimática (Sticklen, 2008; Phitsuwan *et al.*, 2013). De uma forma geral, pode-se considerar que estes materiais possuem em sua composição, aproximadamente 50-75% de polissacarídeos (base seca), apresentando em suas unidades monoméricas valiosos glicosídeos (açúcares).

Celulose é um polissacarídeo linear de milhares de monômeros de D-anidroglicopiranose ligados entre si por ligações glicosídicas β (1→4) (Zhang e Lynd, 2004), sendo esse o biopolímero mais importante no fluxo global de carbono. Sua produção anual é estimada em $100x10^9$ toneladas anuais (Quiroz-Castañeda e Folch-Mallol, 2013). Este polissacarídeo pode ser produzido por organismos fotossintéticos, como plantas superiores e algas, mas também pelos não fotossintéticos como bactérias, invertebrados marinhos, fungos e amebas.

A hemicelulose está intimamente associada à celulose e, em conjunto, esses dois polissacarídeos são o material carbonáceo mais abundante nos vegetais. Esta macromolécula, ao contrário de celulose, possui natureza heteropolissacarídica e um considerável grau de ramificação, o que a torna uma substância amorfa. A hemicelulose é constituída, em sua grande maioria, de uma mistura de polissacarídeos com baixa massa molecular, como: xilanas, arabinanas, arabinoxilanas, mananas e galactomananas. As unidades fundamentais (monômeros) são, basicamente, moléculas de D-xilose (via de regra, o açúcar majoritário), D-manose, D-galactose, D-glucose e L-arabionose, L-arabinose, ácido D-glucurônico, ácido D-galacturônico, ácido *α*-D-4-*O*-methylglucurônico e também alguns produtos de oxidação, como, por exemplo, acetatos.

A lignina é uma macromolécula composta por unidades de fenil propano com substituintes metoxila no anel aromático e, entre essas unidades, existem principalmente ligações do tipo éter. É uma macromolécula amorfa, altamente complexa e ramificada tridimensionalmente, gerada a partir da polimerização desidrogenativa dos álcoois hidroxicinamílicos: *p*-cumarílico, coniferílico e sinapílico. A lignina possui alta massa molecular e representa cerca de 25% da biomassa produzida pela fotossíntese, retendo 50% a mais de carbono do que a celulose. O fato de a lignina envolver as células funcionando como uma "cola" dificulta a biodegradação da biomassa lignocelulósica, protege o vegetal contra o ataque de microrganismos e confere coesão à estrutura interna além de resistência ao esforço mecânico (Fengel e Wegener, 1989; Hofrichter, 2002; Reading *et al.*, 2003).

Para ressaltar a abundância desses polissacarídeos, em geral, dois terços da energia contida nos carboidratos da cana-de-açúcar são estocados sob a forma de polissacarídeos (Soccol *et al.*, 2010). Estas importantes frações, contendo valiosos carboidratos, podem representar até 75% dos componentes da parede celular dos vegetais e podem ser convertidas a açúcares para serem utilizados em rotas bioquímicas, que lançam mão de processos enzimáticos e fermentativos (Lynd *et al.*, 1991, Bayer *et al.*, 2007; Van Dyk e Pletschke, 2012).

O conhecimento acerca das características principais desses polissacarídeos é fundamental para a elaboração de estratégias adequadas para o aproveitamento de resíduos lignocelulósicos no que diz respeito à obtenção de bioprodutos, como o etanol. A Tabela 10.1 apresenta as principais diferenças entre celulose e hemicelulose (Pereira Jr. *et al.*, 2008, Barcelos *et al.*, 2014).

Tabela 10.1

Diferenças entre celulose e hemicelulose

CELULOSE	HEMICELULOSE
Consiste em unidades de glicose	Consiste em várias unidades de pentoses e hexoses
Alto grau de polimerização (1.000 a 18.000)	Baixo grau de polimerização (50 a 300)
Forma arranjo fibroso	Não forma arranjo fibroso
Apresenta regiões cristalinas e amorfas	Apresenta apenas regiões amorfas
Lentamente atacada por ácidos inorgânicos diluídos a quente	Rapidamente atacada por ácidos inorgânicos diluídos a quente
Insolúvel em álcalis	Solúvel em álcalis

Fonte: Pereira Jr. *et al.* (2008).

Tabela 10.2

Efeitos dos principais pré-tratamentos da biomassa lignocelulósica

PRÉ-TRATAMENTO	SOLUBILIZAÇÃO DA HEMICELULOSE	REMOÇÃO DA LIGNINA	ACESSIBILIDADE DA CELULOSE	GERAÇÃO DE INIBIDORES	POSSIBILIDADE DE UTILIZAR CELULOSE E HEMICELULOSE	AUMENTO NO CONTEÚDO DE CELULOSE NOS SÓLIDOS PRÉ-TRATADOS
Mecânico	sem efeito	sem efeito	+/-	sem efeito	sem efeito	sem efeito
Ácido Diluído	++ (hidrólise)	(lignina ácido solúvel)	+	+/- (fç GS)	++	+
Alcalino	+	++	++	+/-	- (celulose)	++
Oxidação úmida	+	++	++	-	+/-	+
Hidrotérmico	+	(lignina ácido solúvel)	+	-	+	+
Explosão com vapor	+ (hidrólise parcial)	(lignina ácido solúvel)	+	+/- (fç GS)	++	+
Explosão com vapor catalisada	++ (hidrólise)	(lignina ácido solúvel)	+	+/- (fç GS)	++	+
Expansão da fibra com amônia	+/-	Rompe ligações lignina-carboidrato	++	-	+	-

{B}+: efeito de grande importância; **-**: efeito de pouca importância.

GS: grau de severidade

A conversão de material lignocelulósico em bioprodutos requer basicamente quatro etapas (Guragain *et al.*, 2014; Dimarogona *et al.*, 2013):

a) Pré-tratamento de material.
b) Hidrólise da celulose e da hemicelulose em açúcares simples.
c) Fermentação desses açúcares em bioprodutos, mediante ação de leveduras ou bactérias.
d) Purificação do produto final.

10.5.1. Pré-tratamento do material lignocelulósico

A matéria-prima lignocelulósica, em virtude de sua estrutura e composição, apresenta obstáculos para sua utilização direta nos processos de conversão. A estrutura cristalina da celulose e a associação lignina-celulose são responsáveis por tornar o material mais resistente à hidrólise e dificultar o acesso enzimático ou biológico ao substrato. Desta forma, torna-se fundamental uma etapa de pré-tratamento para disponibilizar os açúcares para a produção de substâncias químicas a partir da biomassa lignocelulósica. (Menon e Rao, 2012).

Shin *et al.* (2009) estabelecem que apenas 10-20% dos polissacarídeos presentes na biomassa são convertidos a monossacarídeos em processos de hidrólise enzimática utilizando material *in natura* (*apud* Yoon *et al.*, 2014).

Superar a recalcitrância (resistência da parede celular das plantas à desconstrução) da biomassa lignocelulósica é um passo fundamental na produção de biocombustíveis e produtos químicos. A recalcitrância ocorre devido à estrutura altamente cristalina da celulose, que é envolvida numa matriz macromolecular de lignina e hemicelulose, como descrito anteriormente. O principal objetivo do pré-tratamento é de superar esta recalcitrância, separando a celulose dos outros componentes poliméricos da matriz, e torná-la mais acessível à hidrólise enzimática. A literatura reporta que o pré-tratamento das biomassas

lignocelulósicas pode aumentar o rendimento de açúcar a valores superiores a 90% do rendimento teórico.

Numerosas estratégias de pré-tratamento têm sido desenvolvidas para aumentar a reatividade da celulose e o rendimento em açúcares fermentáveis. Objetivos típicos do pré-tratamento incluem: (1) A produção de sólidos altamente digeríveis que aumentem os rendimentos de açúcar durante a hidrólise enzimática, (2) assim evitando a sua degradação (formação de compostos furânicos decorrentes da desidratação ácida de açúcares), (3) minimização da formação de inibidores para as etapas subsequentes de fermentação, (4) recuperação de lignina para a conversão em coprodutos valiosos, e (5) ser eficiente operando em reatores de tamanho moderado e minimizando requisitos energéticos.

Os pré-tratamentos são geralmente classificados em físicos, químicos, físico-químicos e biológicos. Os pré-tratamentos físicos envolvem a redução do tamanho das partículas da biomassa e da cristalinidade por moagem ou trituração. Resultados de hidrólise melhorados são atribuídos à redução da cristalinidade e uma melhoria nas características de transferência de massa devido à redução do tamanho das partículas. A escolha do pré-tratamento, ou a combinação de dois métodos, será em função do tipo da biomassa e da destinação pretendida.

Os efeitos produzidos no material podem variar segundo o tipo de pré-tratamento, mas mesmo assim esta importante etapa do processamento da biomassa lignocelulósica apresenta objetivos comuns que beneficiam o processo hidrolítico das frações polissacarídicas, elencados na sequência (Pereira Jr *et al.*, 2008):

1. Reduzir o tamanho das partículas do material lignocelulósico.
2. Superar a recalcitrância (resistência da parede celular à desconstrução).
3. Fracionar (separar/solubilizar) os componentes do complexo lignocelulósico.
4. Causar turgescência (inchaço) das microfibrilas.
5. Aumentar a porosidade dos sólidos.
6. Causar o rompimento das fibras.
7. Reduzir o grau de polimerização de celulose.
8. Promover parcial descristalização da celulose.
9. Romper as ligações lignina-carboidrato.
10. Aumentar a área de superfície da matriz sólida.
11. Aumentar a acessibilidade da celulose ao ataque enzimático.
12. Gerar meios prontamente fermentávieis (tanto da hemicelulose quanto da celulose).
13. Minimizar reações indesejadas (geração de substâncias tóxicas).

Aspectos relevantes do pré-tratamento

Não há um pré-tratamento universal. Na maioria dos casos, processos térmicos são necessários e deve-se avaliar o sinergismo existente entre as variáveis de processo envolvidas. Se a decisão for a utilização de toda a porção carboidrato, o pré-tratamento deverá estar preferencialmente associado a um processo de hidrólise da hemicelulose, cujo hidrolisado deve ser prontamente fermentável por microrganismo com atividade preparatória. É essencial a redução prévia da

recalcitrância da biomassa para que seja eficientemente atacada por enzimas. A composição do material sólido pré-tratado deve estar mais suscetível à hidrólise enzimática por celulases (aumento da digestibilidade da celulose). Adicionalmente, elevados rendimentos em açúcar são vitais. O aumento dos rendimentos via otimização do pré-tratamento é uma condição *sine qua non* para redução dos custos unitários do processo. Os critérios para o sucesso do pré-tratamento incluem: minimização da degradação da lignina (lignina ácida) e dos carboidratos (compostos furânicos), ser de baixo custo energético e de capital e incluir a recuperação dos insumos químicos utilizados.

Principais tecnologias de pré-tratamento

Cominuição mecânica da biomassa lignocelulósica por intermédio de fragmentação, trituração ou moagem, que são utilizadas para reduzir o tamanho das partículas, podendo-se chegar a valores entre 0,2 a 2 mm. A redução do tamanho das partículas resulta no aumento da área superficial específica e na redução do grau de polimerização dos principais componentes da biomassa lignocelulósica. Outro resultado desses pré-tratamentos é a redução da cristalinidade da celulose. Resultados de hidrólise elevados são atribuídos à melhoria nas características de transferência de massa devido à redução do tamanho das partículas (Brodeur *et al.*, 2011).

Biológico. As tecnologias de pré-tratamento, em sua grande maioria, exigem equipamentos e instrumentos onerosos e são bastante intensivas em energia, em particular os processos físicos e termoquímicos que requerem grande aporte de energia para a desconstrução da biomassa. Tratamentos biológicos que usam vários tipos de fungos ligninolíticos têm sido considerados métodos seguros e amigáveis ao meio ambiente. Este tipo de pré-tratamento está cada vez mais sendo defendido por englobar processos de baixa intensidade energética para a remoção da lignina. Neste tipo de pré-tratamento são utilizados fungos da podridão branca e da podridão marrom que degradam a lignina e a hemicelulose, preferencialmente, com pouca ação sobre a celulose. Os fungos da podridão branca atacam principalmente a lignina, enquanto os da podridão marrom atacam hemicelulose e lignina. A degradação da lignina ocorre pela ação de enzimas tais como as peroxidases (lignina e manganês peroxidases) e lacases (Saritha *et al.*, 2012). Mesmo que os pré-tratamentos biológicos envolvam condições moderadas e sejam de baixo custo, as desvantagens deste pré-tratamento estão relacionadas com as baixas taxas de hidrólise e os longos tempos necessários em comparação com outras tecnologias (Kumar *et al.*, 2009).

Alcalino. NaOH, KOH e $Ca(OH)_2$ são geralmente usados. As primeiras reações que ocorrem são a solvatação e saponificação, o que provoca um estado túmido (inchado) da biomassa e a torna mais acessível às enzimas e ao ataque microbiano. Em elevadas concentrações de álcalis, dissolução, condensação, ataques a grupos terminais da biomassa, hidrólise alcalina, degradação e decomposição de polissacarídeos podem ocorrer. O pré-tratamento alcalino a altas temperaturas rompe as ligações éter-fenilpropano, formando grupos fenólicos, responsáveis pela solubilização da lignina. Xilanas podem ser seletivamente removidas. A

temperatura é mantida baixa durante a extração (temperatura ambiente ou mais baixa) para prevenir reações de degradação. Glucomananas e xilanas podem ser ambas sujeitas à reação de degradação. A hidrólise alcalina envolve a saponificação das ligações cruzadas intermoleculares dos grupamentos éster associados a xilanas e a outros componentes. A porosidade da biomassa aumenta com a remoção das ligações cruzadas. A eficiência da hidrólise alcalina depende do substrato e das condições de pré-tratamento, sendo mais efetiva para biomassas com baixo conteúdo em lignina como os resíduos agrícolas. Este pré-tratamento visa fundamentalmente a remoção da lignina. A cristalinidade da celulose pode aumentar com a deslignificação devido à remoção de componentes amorfos (lignina e hemicelulose) (Kumar *et al.*, 2009).

Ácido diluído. O pré-tratamento com ácidos diluídos envolve a utilização de ácidos minerais para romper a estrutura rígida do material lignocelulósico. O mais comumente usado é o ácido sulfúrico (H_2SO_4), que tem sido comercialmente usado para o pré-tratamento de vários tipos de biomassa - *switchgrass*, palha de milho, bagaço de cana, abeto vermelho e álamo. Outros ácidos também têm sido empregados, tais como o ácido clorídrico (HCl), o ácido fosfórico (H_3PO_4) e o ácido nítrico (HNO_3). Este pré-tratamento visa a solubilização e hidrólise da hemicelulose e, como consequência, torna a celulose mais acessível à posterior hidrólise enzimática. Principais reações deste pré-tratamento são: hidrólise da hemicelulose, especialmente xilanas, já que glucomananas são relativamente estáveis em ambientes ácidos. Hemiceluloses solubilizadas (oligômeros) são sujeitos a reações hidrolíticas gerando monômeros (xilose), furfural, HMF e outros produtos voláteis. Há que se considerar também a solubilização de uma pequena fração da lignina ácida (5-8%). Devido a sua capacidade para remover a hemicelulose, pré-tratamentos ácidos têm sido utilizados como parte dos processos globais para fracionar os componentes de biomassa lignocelulósica e aproveitar a totalidade da porção carboidrato (C5 e C6) (Barcelos *et al.*, 2014, Taherzadeh e Karimi, 2008).

Explosão com vapor. Este pré-tratamento físico-químico é uma das opções mais comumente utilizadas com o objetivo de romper a estrutura do material lignocelulósico. Neste pré-tratamento hidrotérmico, o material é submetido a altas pressões e temperaturas por um curto período de tempo, após o qual o sistema é despressurizado rapidamente, rompendo/desorganizando a estrutura das fibrilas. O rompimento das fibrilas aumenta a acessibilidade das enzimas à celulose durante a hidrólise. O tamanho das partículas é um fator importante que contribui na eficácia do processo, e tem-se verificado que, relativamente, partículas de grandes tamanhos foram capazes de produzir elevadas concentrações de açúcar. Este é um achado promissor, uma vez que a diminuição/cominuição do tamanho das partículas do material requer processamento mecânico da matéria-prima, o que aumenta os custos de produção. As temperaturas variam de 190°C a 270°C com tempos de residência variando de 10 minutos a 1 minuto, respectivamente. Catalisadores ácidos (anidridos ou ácidos minerais) têm sido utilizados na explosão com vapor em quantidades diluídas, a fim de melhorar a hidrólise da hemicelulose durante o pré-tratamento e aumentar a digestibilidade da celulose. A utilização de

ácidos diluídos apresenta a vantagem de diminuir o tempo de retenção e a temperatura de operação quando comparado com a explosão com vapor não catalisada (Kaar *et al.*, 1998).

Hidrotérmico. Este pré-tratamento é denominado na literatura inglesa como *liquid hot water* e é muito parecido com o processo de explosão com vapor. Este pré-tratamento utiliza água a temperaturas (170-230°C) e pressões elevadas (5 Mpa) a fim de manter a água na sua forma líquida, promovendo a desintegração e fracionamento da matriz lignocelulósica. A biomassa é pré-tratada com água quente ao invés de vapor. O objetivo deste pré-tratamento é solubilizar a hemicelulose, deixando a celulose mais acessível à hidrólise enzimática, bem como evitar a formação de inibidores (condições de baixa severidade) e, dessa forma, aumentar a fermentabilidade das frações geradas. A lignina solubilizada encontra-se em baixas concentrações, contudo, as demandas energética e de água são elevadas (Bobleter e Cocin, 1979).

Expansão da fibra com amônia. Este processo é outro pré-tratamento físico-químico, assim como a explosão com vapor, no qual a biomassa lignocelulósica é exposta à amônia líquida em temperaturas moderadas e pressão elevada por um período de tempo, após o qual a pressão é subitamente reduzida. Os parâmetros que afetam este pré-tratamento são: a quantidade de amônia, temperatura, conteúdo de água, redução da pressão e tempo de exposição. A amônia tem um efeito no complexo lignocelulósico que causa a sua tumefação e desorganização física das fibras, seu rompimento, descristalização parcial da celulose e ruptura das ligações lignina-carboidrato. Uma vantagem deste pré-tratamento é a possibilidade da recuperação da amônia. As temperaturas moderadas (60°C-100°C) são significativamente menores do que aquelas do processo de explosão com vapor, o que significa menor consumo de energia. O grau de disrupção do complexo lignocelulósico dependerá da temperatura, uma vez que irá afetar a rapidez da vaporização do amoníaco dentro do reator durante a despressurização. O tempo de permanência pode variar de valores baixos (5 a 10 min) a moderados (30 min). Assim como o processo de explosão com vapor, a mistura do amoníaco com a biomassa deve ser saturada por um período de tempo no reator pressurizado antes da temperatura ser reduzida a temperatura atmosférica. Esta rápida expansão do gás amoníaco causa um inchaço da matéria-prima, ocasionando um rompimento na ligação lignina-carboidrato, hidrólise de hemicelulose, amonólise de ligações cruzadas com o ácido glucurônico e a descristalização parcial da estrutura da celulose. O resultado é uma maior área superficial e um aumento na acessibilidade da celulose ao ataque enzimático. A recuperação da amônia é então necessária para reduzir os custos operacionais do pré-tratamento. Este pré-tratamento não remove a lignina ou quaisquer outras substâncias a partir da biomassa; no entanto, os complexos de lignina-carboidratos são clivados, e a lignina é depositada sobre a superfície do material, o que pode criar um obstáculo à ação de celulases sobre a celulose. É conhecido na literatura inglesa como AFEX (Ammonia Fiber Expansion) (Wyman *et al.*, 2005).

Oxidação úmida. É o processo de tratamento do material com água e ar ou oxigênio em temperaturas acima de 120°C. Combinação de pré-tratamentos

alcalinos e oxidação úmida reduz a formação de furaldeídos e fenolaldeídos, que são tóxicos aos microrganismos fermentadores. A oxidação úmida aumenta o teor de celulose como resultado da solubilização da hemicelulose e da lignina. Foi também relatado que este pré-tratamento combinado com álcalis prontamente oxida a lignina, facilitando a hidrólise enzimática dos polissacarídeos. Concentrações negligenciáveis de furfural e hidroximetilfurfural foram relatadas durante este pré-tratamento. No processo contendo água, a hemicelulose dissolvida e os ácidos carboxílicos podem ser diretamente utilizados como fonte de nutrientes para o crescimento fúngico e produção de enzimas (Brodeur *et al.*, 2011).

Processo Organosolv. Resulta em elevada remoção de lignina e perda mínima de celulose. Numerosos solventes orgânicos ou misturas aquosas de solventes podem ser utilizados, incluindo metanol, etanol, acetona, etilenoglicol e álcool tetra-hidrofurfurílico, a fim de solubilizar a lignina e permitir a sua recuperação relativamente pura. No entanto, os altos preços comerciais de solventes dificultam as suas aplicações industriais para a descontrução da biomassa lignocelulósica (Wood e Saddler, 1988).

Líquidos iônicos. Os líquidos iônicos são a nova classe de solventes com baixo ponto de fusão (menor que 100°C), ampla faixa de temperatura, alta polaridade, elevada estabilidade térmica e química, não inflamáveis, com pressão de vapor negligenciável, constituído por íons, apresentando excelentes propriedades de solvência. As ligações de hidrogênio entre as cadeias moleculares da celulose são rompidas na interação de celulose-OH e os líquidos iônicos e, desta forma, a celulose é dissolvida. Após a dissolução em líquido iônico, a celulose pode ser regenerada pela adição de água, etanol ou acetona à solução, que resulta na sua precipitação. Devem ser retirados antes da hidrólise enzimática da celulose, já que as celulases têm suas atividades afetadas na presença desses solventes. Desta forma, o uso de líquidos iônicos constitui-se em um excelente pré-tratamento da biomassa lignocelulósica, por resultar na redução de cristalinidade da celulose e, consequentemente, aumentar os rendimentos no processo hidrolítico para a geração de açúcares fermentáveis. Os líquidos iônicos são sais, tipicamente compostos de um pequeno anion e um grande cation orgânico. Uma variedade de líquidos iônicos é descrita na literatura, particularmente sais de imidazólio, por potencializar a digestibilidade da biomassa lignocelulósica. Em geral, estes líquidos iônicos também são considerados "solventes verdes" por serem amigáveis ao meio ambiente. Apresentam alto custo de obtenção e sua aplicação industrial ainda está sob investigação (Tadesse e Luque, 2011).

10.5.2. Hidrólise enzimática do material lignocelulósico

O material lignocelulósico pode ser convertido, de forma efetiva, em açúcares simples e posteriormente fermentados por meio de, basicamente, duas vias: enzimática ou química catalisada por ácidos (diluídos ou concentrados) (Maitan-Alfenas *et al.*, 2015).

A hidrólise ácida é caracterizada por ser um processo rápido. Porém, requer medidas especiais, particularmente referentes à corrosão. Além disso, neste

processo, a fração hemicelulósica é hidrolisada anteriormente e de forma rápida em comparação com a celulose. Desta forma, os monossacarídeos provenientes da hemicelulose permanecem expostos por muito tempo no meio reacional, sendo mais facilmente degradados a compostos tóxicos (compostos furânicos) para a fermentação (Zheng *et al.*, 2009).

Neste sentido, a hidrólise enzimática torna-se mais vantajosa por requerer menos energia e as condições reacionais são mais brandas. Adicionalmente, as enzimas apresentam alta especificidade e não geram inibidores para a posterior etapa de fermentação, resultando em rendimentos melhores. Algumas desvantagens são os maiores tempos de reação e o alto custo das enzimas (Gupta e Verma, 2015; Maitan-Alfenas *et al.*, 2015).

Existem diferentes enzimas capazes de degradar todo o material lignocelulósico. A decomposição do material envolve a ação de celulases, hemicelulases, ligninases e pectinases. Na Tabela 10.3 é apresentado um resumo das principais enzimas lignocelulolíticas.

Tabela 10.3

Algumas das principais enzimas degradadoras do material lignocelulósico

Fração	**Enzimas**
Celulose	endoglucanase, exoglucanase e β-glucosidase
Hemicelulose	endo-xilanase, β-xilosidase, endo-mananase, acetil xilana esterease, α-l-arabino furanosidase, α-galactosidase,
Lignina	lacase, manganês peroxidase, lignina peroxidase
Pectina	pectil metil esterease, poligalacturonase

Fonte: Van Dyk e Pletschke (2012).

As celulases pertencem ao grupo das glicosil hidrolases, enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise de ligações glicosídicas, e apresentam especificidade pelas ligações glicosídicas β-1,4 presentes na celulose. Tradicionalmente, a hidrólise enzimática da fração celulósica é atribuída à ação de três principais grupos de enzimas: endoglucanases, exoglucanases e β-glucosidases, que atuam em sinergismo (Castro e Pereira Jr., 2010).

As endoglucanases propiciam a rápida solubilização do polímero celulósico (redução do grau de polimerização) e são responsáveis por iniciar a hidrólise, atuando randomicamente em regiões internas da fibra celulósica, liberando oligossacarídeos e, consequentemente, terminais redutores e não redutores. As enzimas exoglucanases atuam nas extremidades da cadeia, liberando como produto principal celobiose (dissacarídeo de moléculas de glicose unidas por ligações do tipo β-1,4). O grupo das β-glucosidases, por sua vez, catalisa a hidrólise da celobiose a glicose, podendo atuar em oligossacarídeos solúveis (Castro e Pereira Jr., 2010; Bai *et al.*, 2013; Falkoski, *et al.*, 2013).

Além das enzimas do complexo celulásico, estudos têm demostrado que a presença de proteínas não hidrolíticas, denominadas proteínas auxiliares, pode diminuir a recalcitrância da biomassa, favorecendo o processo enzimático. Entre estas estão: módulo de ligação ao carboidrato (CBMs), expansinas e swoleninas

(Dimarogona *et al.,* 2013). Outras proteínas consideradas auxiliares podem contribuir na hidrólise da celulose mediante mecanismos oxidativos (monooxigenases polissacarídicas líticas). A Tabela 10.4 apresenta um resumo das principais proteínas não hidrolíticas que atuam em sinergismo com a hidrólise enzimática da celulose.

Tabela 10.4

Proteínas acessórias que atuam em sinergismo com celulases na hidrólise enzimática da celulose

Classe de proteína	Função molecular ou biológica
Módulo de ligação ao carboidrato (CBM)	Pequenos peptídeos que se ligam às cadeias de polissacarídeos/carboidratos causando desorganização das fibras, redução da cristalinidade, rompimento das ligações de hidrogênio entre as cadeias de celulose. Formam irregularidades na superfície da fibra favorecendo o processo de hidrólise.
Expansinas de plantas	Aumentam a extensão das microfibrilas, provocam afrouxamento e desorganização da parede celular; proteínas envolvidas na interação microrganismos e plantas e em outros processos de desenvolvimento celular de plantas; solubilizam açúcares oligoméricos.
Swolenina/Expansinas microbianas	Provocam afrouxamento da parede celular/dissolução da celulose, delaminação de microfibrilas, dispersão, "inchaço" de agregados de celulose.
Monooxigenases	Clivagem oxidativa da celulose cristalina.

Fonte: Kim *et al.* (2014).

A hidrólise da fração hemicelulósica requer um grupo mais complexo de enzimas em comparação com a fração celulósica. As enzimas que degradam a hemicelulose podem ser dividas em enzimas que atuam na cadeia principal e as que removem os grupos laterais (Van Dyk e Pletschke, 2012).

A hidrólise enzimática completa de xilanas, um dos principais polissacarídeos que compõem a cadeia principal da hemicelulose, requer a ação das endo-β-1,4-xilanases, que atuam aleatoriamente nas ligações internas da cadeia principal, liberando xilooligossacarídeos, e das β-xilosidases, que catalisam a hidrólise desses oligossacarídeos a partir de terminais não redutores, liberando xilose. (Maitan-Alfenas *et al.,* 2015). Analogamente, caso a cadeia principal seja formada por mananas, é requerida a ação das endo-mananases e das β-mananases (Van Dyk e Pletschke, 2012).

Diferentes grupos podem estar ligados à cadeia principal da hemicelulose, a exemplo de arabinose, acetil, galactose e glicose. Portanto, para a remoção desses grupos laterais é necessária a ação de enzimas específicas como α-L-arabino furanosidases, α-D-glicuronidases, acetil xilana esterases, ácido ferúlico esterases e ácido p-cumárico esterases, α-galactosidase, entre outras (Maitan-Alfenas *et al.,* 2015; Okeke, 2009), de modo a permitir o acesso de enzimas que clivam a cadeia principal e, consequentemente, promover a degradação da fração hemicelulósica (Van Dyk e Pletschke, 2012).

10.5.3. Estratégias para a produção de etanol 2G

Em virtude da complexidade do material lignocelulósico, diferentes abordagens para a conversão destes materiais em etanol (Figura 10.7) têm sido estudadas. Pode-se destacar 5 estratégias, cada uma em diferente estágio de desenvolvimento, descritas na sequência.

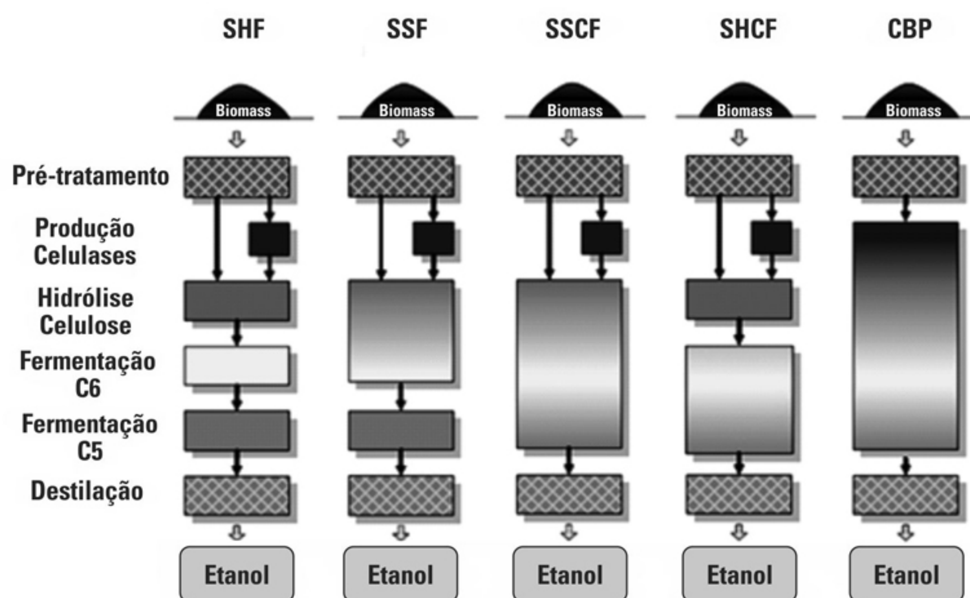


FIGURA 10.7 Concepções tecnológicas e integração de processo na produção de Etanol 2G. SHF. Hidrólise e Fermentação Separadas; SSF (Sacarificação e Fermentação Simultâneas); SSCF (Sacarificação e Cofermentação Simultânea); SHCF (Hidrólise e Cofermentação Separadas); e CBP (Bioprocesso Consolidado). *Fonte*: Adaptado de Pereira Jr. *et al.* (2008) *apud* Wingren (2003).

SHF – Hidrólise e Fermentação Separadas. Sigla proveniente da expressão inglesa *Separate Hydrolysis and Fermentation*, é a concepção mais antiga na qual a hidrólise enzimática da celulose ocorre em estágio separado da fermentação. Esta concepção foi deixada de lado por algum tempo pelo fato de os coquetéis enzimáticos à época de sua implementação serem fortemente inibidos pelos produtos finais da ação enzimática, nomeadamente celobiose e glicose.

SSF – Sacarificação e Fermentação Simultâneas. Sigla cuja origem é proveniente da expressão inglesa *Simultaneous Saccharification and Fermentation*, como o próprio nome diz, a hidrólise da fração celulósica e fermentação de seus açúcares ocorrem numa mesma etapa. Neste caso, reduz-se a questão da inibição das enzimas do complexo celulásico, na medida em que glicose é gerada e simultaneamente convertida a etanol. A fração hemicelulósica é hidrolisada e fermentada em etapas separadas, como também a produção de enzimas do complexo celulásico. A temperatura do processo SSF tem que ser compatível com aquela de desempenho da levedura (35°C) e menor do que a temperatura ótima de ação das enzimas do

complexo celulásico (50-60°C). Isto leva a uma maior carga de enzima do que a necessária para despolimerizar a celulose em glicose, com um custo de celulases associado maior, obviamente; o que é uma desvantagem desta concepção tecnológica.

SSCF – Sacarificação e Cofermentação Simultâneas. Diferentemente da estratégia SSF, neste caso a fermentação dos açúcares das frações celulósica e hemicelulósica ocorre no mesmo equipamento. Isto reduz o número de fermentadores envolvidos e também evita os problemas associados à inibição enzimática pelos produtos de hidrólise. No entanto, investimentos são necessários para a construção de micro-organismos recombinantes capazes de fermentar ambos os açúcares (glicose e xilose), já que não há registros de micro-organismos naturalmente ocorrentes capazes de fermentar eficientemente pentoses e hexoses (Paulova, 2014).

SHCF – Hidrólise e Cofermentação Separadas. Ao longo dos últimos 10 anos, novos coquetéis enzimáticos não tão suscetíveis à inibição pelos produtos finais do processo hidrolítico foram desenvolvidos, permitindo que a hidrólise enzimática pudesse ocorrer em reator diferente ao da fermentação. Isto trouxe importantes vantagens no escalonamento e na industrialização do processo de produção do etanol 2G, na medida em que fermentadores convencionais, utilizados na produção do etanol 1G pudessem ser empregados com as vantagens decorrentes sob o ponto de vista de engenharia. Esta estratégia também traz facilidades no que tange à integração da produção de etanol 1G com 2G, na mesma unidade fabril. Assim, a hidrólise enzimática com altas cargas de sólidos ocorre em uma etapa separada da produção de etanol, ambas com suas condições operacionais ótimas, principalmente no que se refere à temperatura. Nesta última, as correntes líquidas C5 (proveniente do pré-tratamento associado a um processo de hidrólise da hemicelulose) e C6 (oriunda da hidrólise enzimática da celulose, após filtração) são reunidas e cofermentadas. É uma estratégia que se assemelha ao SHF, porém com recursos mais modernos como o emprego de coquetéis enzimáticos de última geração e de micro-organismos geneticamente modificados.

CBP – Bioprocesso Consolidado. É a concepção mais avançada, em que todas, ou pelo menos três etapas, encontram-se integradas. No CBP, etanol e todas as enzimas necessárias são produzidos no mesmo biorreator. Com as ferramentas modernas da biologia molecular existem possibilidades de se expressarem várias atividades em apenas um microrganismo, sejam elas associadas à capacidade de produção das enzimas do complexo celulásico e hemicelulásico, bem como à habilidade de fermentação eficiente de pentoses e hexoses. Esta concepção do processo de produção de etanol 2G parece ser o ponto lógico final da evolução das tecnologias de conversão da biomassa lignocelulósica, sendo uma perspectiva de médio para longo prazo (Castro e Pereira Jr., 2010). Ressalta-se que há na natureza grupos bacterianos com a habilidade de realizar todas essas etapas de forma simultânea para a produção do etanol 2G. Os sistemas enzimáticos desses microrganismos são denominados de celulossomas, estruturas enzimáticas complexas, aderidas à parede celular de anaeróbios do gênero Clostridium. No entanto, esses micro-organismos, consomem os açúcares C5 e C6 em um processo

heterofermentativo, ou seja, além do etanol há a formação de subprodutos que diminuem o rendimento do principal produto e, adicionalmente, essas bactérias apresentam baixa tolerância ao etanol.

10.6. Etanol de terceira geração (etanol 3g): tecnologias portadoras de futuro

As tecnologias que envolvem a utilização de biomassa algal para a obtenção de etanol e de outros produtos químicos recebe a denominação de biorrefinaria de terceira geração. Consequentemente, o etanol produzido a partir desta classe de biomassas também é designado de etanol de terceira geração, ou Etanol 3G.

Trata-se de uma matéria-prima para a produção de etanol portadora de futuro, já que a sua utilização para este fim tem sido vislumbrada há pouco tempo (Hargreaves *et al.*, 2013). Uma de suas maiores vantagens sobre as demais biomassas é que não requerem a disponibilização de terras agricultáveis para sua produção, nem tampouco da infraestrutura complexa que as biomassas terrestres demandam (John *et al.*, 2011).

No ecossistema marinho, as algas desempenham papel fundamental. São responsáveis pela elevada taxa de fotossíntese, além de importantes produtoras de O_2 e matéria orgânica. Desta forma, contribuem para a estabilidade do bioma marinho, proporcionando alimento e abrigo aos demais organismos (Barcelos *et al.*, 2014).

Normalmente, a biomassa algal é agrupada em duas categorias, baseadas em sua morfologia e tamanho: microalgas e macroalgas. As microalgas são microrganismos fotossintetizantes unicelulares que crescem (ou estão presentes) em água doce ou salgada, enquanto as macroalgas se caracterizam por serem multicelulares e macroscópicas, possuindo estruturas similares às plantas terrestres que lembram raízes, caules e folhas de plantas superiores. Estas, em geral, crescem rapidamente e são capazes de alcançar até 60 metros de comprimento (Demirbas, 2010; Jonh *et al*., 2011; Anastopoulos e Kyzas, 2015).

Além disso, as algas possuem taxas de crescimento e de absorção de CO_2 superiores às de outros vegetais, sendo caracterizadas por altas eficiências fotossintéticas em comparação com as biomassas terrestres (Park *et al*., 2012; Jung *et al*., 2013). A Figura 10.8 compara o potencial de produção de biomassa de diferentes plantas terrestres em relação às algas (micro e macro). Observa-se que os valores de produtividade em biomassa (tonelada/hectare/ano) no caso das macroalgas são quase seis vezes superiores aos da cana-de-açúcar, uma das principais matérias-primas para a produção de etanol.

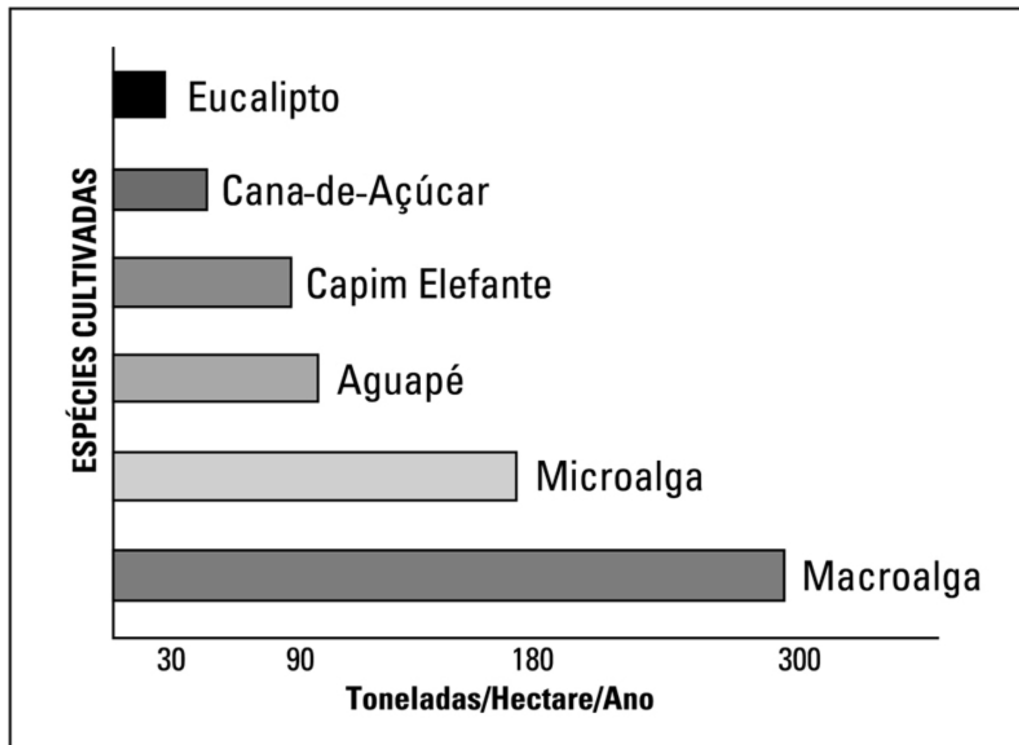


FIGURA 10.8 Potencial na produção de biomassa por espécie (em massa seca). *Fonte*: Tseng (2001) e Wolverton e McDonald (1979).

Existem muitas características que afetam a classificação de microalgas, a exemplo da pigmentação, dos arranjos de membranas fotossintéticas ou outras características morfológicas. Atualmente, são classificadas em quatro grupos: diatomáceas, algas verdes, algas douradas e cianobactérias (algas azuis-verdes) (Demirbas *et al.*, 2010; Anastopoulos e Kyzas, 2015).

As macroalgas, por sua vez, de acordo com seu pigmento, são classificadas em três grandes grupos: *Phaeophyta* (algas pardas, ou marrons), *Chlorophyta* (algas verdes) e *Rhodophyta* (alga vermelha) (Rajkumar *et al.*, 2014; Demirbas *et al.*, 2010). Destacam-se por conter em sua composição altos teores de carboidratos que podem ser utilizados na obtenção de biocombustíveis e de outros produtos químicos, desenvolvendo desta forma o conceito de biorrefinaria 3G, como definido anteriormente. Em comparação com as plantas terrestres, as macroalgas apresentam reduzido (ou nenhum) teor de lignina, principal barreira física para aproveitamento dos polissacarídeos de materiais lignocelulósicos, o que as torna estruturalmente bastante flexíveis. Tal característica facilita a obtenção dos monômeros dos polissacarídeos presentes em sua composição para uma posterior etapa de conversão química ou bioquímica.

Além da presença de celulose, laminarina e amido, a partir dos quais podem ser obtidos açúcares fermentáveis, há, em certas algas marinhas, como as algas vermelhas, a presença abundante de ágar-ágar ou carragenana, polímero importante por conter galactose, que pode ser igualmente utilizada para produção de bioetanol e de outras substâncias químicas (John *et al.*, 2011).

As microalgas, normalmente, possuem um alto conteúdo de lipídios, destacando-se como matérias-primas para a produção de biodiesel. Porém, microalgas tais como *Chlorella, Chlamydomonas, Dunaliella, Scenedesmus,* e *Tetraselmis* apresentam, além de lipídios, acúmulo de carboidratos passíveis de emprego na produção de combustíveis como o bioetanol. Estudos recentes, inclusive, têm empregado microalgas — após extração dos lipídios — como matéria-prima para obtenção deste biocombustível. Isto permite ampliar seu aproveitamento como fonte para produção tanto de biodiesel como de bioetanol (John *et al.*, 2011).

A Tabela 10.5 apresenta a porcentagem de carboidratos presentes em diferentes tipos de biomassa algal.

Tabela 10.5

Conteúdo de carboidratos em diferentes tipos de algas

Alga	**Conteúdo de carboidrato (%)**
Ulva fasciata	38,5-47,5
Chlorococcum humicola	32,52
Sargassum sp	41,81
Sargassum kushimonte	42,89
Sargassum cristaefolium	46,78
Gracilaria verrucosa	41-43
Dunaliella tertiolecta	37,8
Chlorella vulgaris	37-55
Ulva lactuca,	54,3
Gelidium amansii	77,2
Laminaria japonica	51,9
Sargassum fulvellum	39,6

Fonte: Noraini *et al.* (2014).

Assim como ocorre para o etanol 2G, na produção do etanol 3G é necessário descontruir o complexo polissacarídeo. Uma etapa de pré-tratamento, portanto, também é essencial para disponibilização total, ou parcial, dos polissacarídeos para as etapas de hidrólise e, em seguida, de fermentação (Barcelos *et al.*, 2014).

No entanto, apesar das similaridades quanto ao processo de produção do etanol a partir de biomassa lignocelulósica (2G), a produção de etanol a partir de biomassa algal (3G) apresenta uma série de vantagens (Li *et al.*, 2014):

1. Não compete por terras ou água destinadas à produção de alimentos.
2. O teor de carboidratos (amido, galactanas e celulose) presente nas células de alga é abundante.
3. As algas não possuem lignina e seus níveis de hemicelulose são baixos, fatores que resultam em um aumento das eficiências de hidrólise e de fermentação.
4. As algas são capazes de utilizar o CO_2 da atmosfera e de usinas, permitindo a redução de gases do efeito estufa.
5. Além de crescerem rapidamente, as algas podem ser facilmente cultivadas em diferentes ambientes aquáticos, tais como água doce, água salina ou águas

residuais municipais.

6. A eficiência fotossintética das algas é elevada. Enquanto a eficiência fotossintética da biomassa terrestre situa-se na faixa de 1,8% a 2,2%, a média da eficiência da biomassa aquática é de 6% a 8%.

Considerando todos esses aspectos, a produção de etanol 3G, portanto, desponta como alternativa portadora de futuro a ser incorporada na produção de biocombustíveis e/ou bioprodutos, aliada à produção de primeira e de segunda gerações. Em comum a estas três abordagens, conforme já enfatizado, está a etapa fermentativa, o "coração" do processo.

10.7. Perspectivas e tópicos para pesquisa

Conforme discutido ao longo do capítulo, embora o processo de produção de etanol seja conhecido e esteja bem estabelecido, há oportunidades e potenciais a serem explorados, principalmente no que diz respeito às denominadas tecnologias de segunda (2G) e terceira geração (3G). Estas tecnologias, apesar de extremamente promissoras, ainda se deparam com alguns obstáculos, cujas soluções requerem integração entre diferentes áreas do conhecimento – Biologia Molecular, Enzimologia, Processos Fermentativos, entre outros, os quais devem ser alvo de intensas pesquisas no futuro. A seguir, são destacados alguns dos principais desafios e perspectivas relativos à produção de etanol biocombustível 2G e 3G:

- Desenvolvimento de tecnologias de pré-tratamento capazes de conjugar geração mínima de substâncias tóxicas (inibitórias) com menores demandas energéticas e elevada disponibilidade do material a ser fermentado.
- Obtenção de formulações enzimáticas provenientes de microrganismos naturalmente ocorrentes e que sejam capazes de promover uma eficiente hidrólise do material lignocelulósico, uma vez que se opta, em geral, pela utilização de preparados comerciais de elevados custos e, consequentemente, encarecendo o processo produtivo.
- Aplicação de técnicas de Biologia Molecular no desenvolvimento de microrganismos geneticamente dotados de características que superponham os obstáculos metabólicos existentes nas tecnologias de conversão das biomassas (1G, 2G e 3G) e habilidade de converter os diferentes tipos de açúcares.
- O desenvolvimento de operações mais modernas, e menos onerosas, em todas as etapas do processo de produção de etanol.
- Investimento em biomassas modernas, especialmente as de composição lignocelulósicas, e associação às unidades de produção de etanol 1G já existentes.
- Explorar intensamente o conceito de biorrefinaria como forma de agregar mais valor à cadeia produtiva do etanol.

Revisão dos conceitos apresentados

- A opção por processos de produção alternativos, que empregam fontes renováveis de matéria-prima, adquire relevância cada vez maior, já que as refinarias e os processos químicos tradicionais, embora responsáveis por grandes progressos ao longo das últimas décadas, têm provocado fortes impactos ambientais que já são sentidos pelo homem em seu cotidiano.
- Na busca por fontes de energia mais limpas, destaca-se a produção de biocombustíveis (etanol, principalmente), capazes de reduzir a queima de combustíveis fósseis e a emissão de CO_2, um dos principais gases responsáveis pelo efeito estufa.

- Há três principais classificações para a produção de etanol biocombustível em relação às fontes das quais é obtido: etanol de primeira geração (1G, a partir de matérias-primas sacaríneas e amiláceas), etanol de segunda geração (2G, proveniente de materiais lignocelulósicos) e etanol de terceira geração (3G, oriundo de biomassa algal).
- A etapa de fermentação é comum às três estratégias (1G, 2G e 3G) para a produção de etanol e envolve a ação de algum microrganismo – geralmente leveduras da espécie *Saccharomyces cerevisiae* – para a conversão do substrato ao álcool de interesse. Uma série de fatores, tais como pH, teor de oxigênio, temperatura e concentrações de substrato e produto exercem influência sobre a fermentação.
- A utilização de matéria-prima lignocelulósica para a produção do etanol 2G requer a realização de uma etapa de pré-tratamento com o objetivo de permitir o posterior acesso enzimático ou biológico ao substrato, uma vez que se trata de materiais cuja complexa estrutura cria barreiras para o aproveitamento direto dos mesmos.
- A hidrólise dos materiais lignocelulósicos pode ocorrer por via química ou enzimática. No caso desta última, tanto para a fração celulósica como para a hemicelulósica, há sinergismos entre as enzimas. As proteínas acessórias, por sua vez, a exemplo de swoleninas, CBMs e expansinas, apesar de não apresentarem ação hidrolítica, permitem uma redução da recalcitrância da biomassa.
- A produção de etanol 3G, além de extremamente promissora, apresenta uma série de vantagens frente à produção do etanol de primeira (1G) e de segunda geração (2G): não compete por terras destinadas à produção de alimentos, as células de alga apresentam elevados teores de carboidratos isentos de lignina, tendo a propriedade de captar eficientemente o CO_2 emitido na atmosfera devido à elevada atividade fotossintética das algas.

Questões

1. Em relação às matérias-primas de origem vegetal (sacaríneas, amiláceas e lignocelulósicas) para a produção de etanol, identifique as principais diferenças na estrutura dos carboidratos presentes e analise como tais diferenças impactam o processo industrial.
2. Estabeleça as principais diferenças nos processos de produção de etanol 1G, 2G e 3G.
3. A partir das informações contidas neste capítulo, faça diagramas de blocos esquemáticos para a produção de etanol 1G, 2G e 3G.
4. Faça uma análise comparativa da atuação das amilases sobre materiais amiláceos, indicando o modo de atuação das enzimas e os produtos de hidrólise.
5. Faça uma análise comparativa da atuação das celulases sobre materiais celulósicos, indicando o modo de atuação das enzimas e os produtos de

hidrólise.

6. Identifique os principais gargalos tecnológicos na produção do etanol de segunda geração.
7. Proponha um diagrama de blocos esquemático para a produção de etanol de segunda geração acoplada à produção de etanol de primeira geração, a partir da cana-de-açúcar.
8. Pesquisa complementar: Quais são os principais contaminantes microbianos na fermentação alcoólica e quais problemas acarretam?

Tópicos para discussão

1. Desafios a serem vencidos para a consolidação da produção industrial de etanol 2G.
2. Alimentos e produção de biocombustíveis: competição ou integração?

Referências

Aldiguier AS, Alfenore S, Cameleyre X, Goma G, Uribelarrea JL, Guillouet SE, Molina-Jouve C. Synergistic temperature and ethanol effect on *Saccharomyces cerevisiae* dynamic behaviour in ethanol bio-fuel production. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2004;26(4):217–222.

Alfenore S, Cameleyre X, Benbadis L, Bideaux C, Uribelarrea JL, Goma G, Guillouet SE. Aeration strategy: a need for very high ethanol performance in *Saccharomyces cerevisiae* fed-batch process. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004;63(5):537–542.

Amorim HV. Fermentação alcoólica: Ciência & Tecnologia. *Piracicaba, SP, Pancrom*. 2005.

Anastopoulos I, Kyzas GZ. Progress in batch biosorption of heavy metals onto algae. *Journal of Molecular Liquids*. 2015.

Baeyens J, Kang Q, Appels L, Dewil R, Lv Y, Tan T. Challenges and opportunities in improving the production of bio-ethanol. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2015;47:60–88.

Bai A, Zhao X, Jin Y, Yang G, Feng Y. A novel thermophilic β-glucosidase from *Caldicellulosiruptor bescii*: characterization and its synergistic catalysis with other cellulases. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*. 2013;85:248–256.

Barcelos C. Aproveitamento das frações sacarínea, amilácea e lignocelulósica do sorgo sacarino [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] para a produção de bioetanol. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química. *Universidade Federal do Rio de Janeiro*. 2012.

Barcelos CA, Hargreaves PI, Schlittler LAF, Pereira Jr N. Produção de etanol combustível: tecnologias maduras, emergentes e portadoras de futuro. In: Perlingeiro Carlos Augusto G, ed. *C.A.G. organizador. Biocombustíveis no Brasil – Fundamentos, Aplicações e Perspectivas*. Rio de Janeiro: Synergia; 2014:83–117.

Bayer EA, Lamed R, Himmel ME. The potential of cellulases and cellulosomes for cellulosic waste management. *Current Opinion in Biotechnology*. 2007;18(3):237–245.

Baysal Z, Uyar F, Doğru M, Alkan H. Production of extracellular alkaline α-amylase by solid state fermentation with a newly isolated *Bacillus sp*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*. 2008;38(2):184–190.

Bobleter O, Cocin R. Degradation of poplar lignin by hydrothermal treatment. *Cellul Chem Technol*. 1979;13:583–593.

Brodeur G, Yau E, Badal K, Collier J, Ramachandran KB, Ramachandran KB, Ramakrishnan S. Chemical and Physicochemical Pretreatment of Lignocellulosic Biomass: A Review. *Enzyme Research*. 2011:17.

Brown MR, Jeffrey SW, Volkman JK, Dunstan GA. Nutritional properties of microalgae for mariculture. *Aquaculture*. 1997;151:315–331.

Bruinenberg PM, de Bot PH, van Dijken JP, Scheffers WA. NADH-linked aldose reductase: the key to anaerobic alcoholic fermentation of xylose by yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1984;19(4):256–260.

Cardona CA, Quintero JA, Paz IC. Production of bioethanol from sugarcane bagasse: status and perspectives. *Bioresource Technology*. 2010;101(13):4754–4766.

Castro AMD, Pereira Jr N. Produção, propriedades e aplicação de celulases na hidrólise de resíduos agroindustriais. *Química Nova*. 2010;33(1):181–188.

Cereda MP. Série: Cultura de Tuberosas Amiláceas Latino Americanas. *São Paulo: Fundação Cargill*. 2001:1773.

Chan CX, Ho CL, Phang SM. Trends in Seaweed Research. *Trends in Plant Science*. 2006;11(4):165–166.

Chandel AK, Antunes FA, Anjos V, Bell MJ, Rodrigues LN, Polikarpov I, da Silva SS. Multi-scale structural and chemical analysis of sugarcane bagasse in the process of sequential acid-base

pretreatment and ethanol production by *Scheffersomyces shehatae* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology for Biofuels*. 2014;7(1):63.

Crabb WD, Mitchinson C. Enzymes involved in the processing of starch to sugars. *Tibtech*. 1997;15:349–352.

Demirbas A. Use of algae as biofuel sources. *Energy Conversion and Management*. 2010;51(12):2738–2749.

Dien BS, Cotta MA, Jeffries TW. Bacteria engineered for fuel ethanol production: current status. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003;63(3):258–266.

Dimarogona M, Topakas E, Christakopoulos P. Recalcitrant polysaccharide degradation by novel oxidative biocatalysts. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013;97(19):8455–8465.

Ellis RP, Chochrane MP, Dale MFB, Duffus CM, Lynn A, Morrison RM, Prentice RDM, Swanston JS, Tiller SA. Starch production and industrial use. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 1998;77:289–311.

Falkoski DL, Guimarães VM, de Almeida MN, Alfenas AC, Colodette JL, de Rezende ST. Chrysoporthe cubensis: a new source of cellulases and hemicellulases to application in biomass saccharification processes. *Bioresource Technology*. 2013;130:296–305.

Folch-Mallol JL, Garay-Arroyo A, Lledías F, Covarrubias Robles AA. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2004;46(1-2):24–46.

Gangadharan D, Sivaramakrishnan S, Nampoothiri KM, Sukumaran RK, Pandey A. Response surface methodology for the optimization of alpha amylase production by *Bacillus amyloliquefaciens*. *Bioresource Technology*. 2008;99(11):4597–4602.

Gírio FM, Fonseca C, Carvalheiro F, Duarte LC, Marques S, Bogel-Łukasik R. Hemicelluloses for fuel ethanol: a review. *Bioresource Technology*. 2010;101(13):4775–4800.

Grosz R, Stephanopoulos G. Physiological, biochemical, and mathematical studies of micro-aerobic continuous ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. I: Hysteresis, oscillations, and maximum specific ethanol productivities in chemostat culture. *Biotechnology and Bioengineering*. 1990;36(10):1006–1019.

Gupta A, Verma JP. Sustainable bio-ethanol production from agro-residues: A review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015;41:550–567.

Guragain YN, Ganesh KM, Bansal S, Sathish RS, Rao N, Vadlani PV. Low-lignin mutant biomass resources: Effect of compositional changes on ethanol yield. *Industrial Crops and Products*. 2014;61:1–8.

Guzmán-Maldonado H, Paredes-López O, Biliaderis CG. Amylolytic enzymes and products derived from starch: a review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*. 1995;35(5):373–403.

Hahn-Hägerdal B, Pamment N. Special session A microbial pentose metabolism. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2004;116(1):1207–1209.

Hansen MR, Blennow A, Pedersen S, Norgaard L, Engelsen SB. Gel texture and chain structure of amylomaltase-modified starches compared to gelatin. *Food Hydrocolloids*. 2008;22(8):1551–1566.

Hargreaves PI, Barcelos CA, Costa ACA, Pereira Jr N. Production of ethanol 3G from *Kappaphycus alvarezii*: Evaluation of different process strategies. *Bioresource Technology*. 2013;134:257–263.

Jeffries TW. Engineering yeasts for xylose metabolism. *Current opinion in biotechnology*. 2006;17(3):320–326.

Jeffries TW, Jin YS. Metabolic engineering for improved fermentation of pentoses by yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004;63(5):495–509.

Jeffries TW, Grigoriev IV, Grimwood J, Laplaza JM, Aerts A, Salamov A, Richardson PM. Genome sequence of the lignocellulose-bioconverting and xylose-fermenting yeast *Pichia stipitis*. *Nature Biotechnology*. 2007;25(3):319–326.

John RP, Anisha GS, Nampoothiri KM, Pandey A. Micro and macroalgal biomass: a renewable source for bioethanol. *Bioresource Technology*. 2011;102(1):186–193.

Jung KA, Lim SR, Kim Y, Park JM. Potentials of macroalgae as feedstocks for biorefinery. *Bioresource Technology*. 2013;135:182–190.

Kaar WE, Gutierrez CV, Kinoshita CM. Steam explosion of sugarcane bagasse as a pretreatment for conversion to ethanol. *Biomass and Bioenergy*. 1998;14(3):277–287.

Kapoor M, Raj T, Vijayaraj M, Chopra A, Gupta RP, Tuli DK, Kumar R. Structural features of dilute acid, steam exploded, and alkali pretreated mustard stalk and their impact on enzymatic hydrolysis. *Carbohydrate Polymers*. 2015;124:265–273.

Karsch T, Stahl U, Esser K. Ethanol production by *Zymomonas* and *Saccharomyces*, advantages and disadvantages. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*. 1983;18(6):387–391.

Kennedy JF, Cabalda VM, White CA. Enzymatic starch utilization and genetic engineering. *Trends in Biotechnology*. 1988;6:184–189.

Kim IJ, Lee HJ, Choi IG, Kim KH. Synergistic proteins for the enhanced enzymatic hydrolysis of cellulose by cellulase. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2014;98(20):8469–8480.

Kumar P, Barrett D, Delwiche MJ, Stroeve P. Methods for Pretreatment of Lignocellulosic Biomass for Efficient Hydrolysis and Biofuel Production. *Ind Eng Chem Res*. 2009;48(8):3713–3729.

Laluce C, Palmieri MC, da Cruz L, Cristina R. Growth and fermentation characteristics of new selected strains of Saccharomyces at high temperatures and high cell densities. *Biotechnology and Bioengineering*. 1991;37(6):528–536.

Leach HW, Schoch TJ. Structure of the starch granule. II. Action of various amylases on granular starches. *Cereal Chemistry*. 1961;38:34–46.

Li K, Liu S, Liu X. An overview of algae bioethanol production. *International Journal of Energy Research*. 2014;38(8):965–977.

Lin Y, Zhang W, Li C, Sakakibara K, Tanaka S, Kong H. Factors affecting ethanol fermentation using *Saccharomyces cerevisiae* BY4742. *Biomass and Bioenergy*. 2012;47:395–401.

Liu Q. A study of enzymatic hydrolysis of starch in potato pulp. *Journal of Food Science: Food Chemistry and Toxicology*. 2002;67:2113–2117.

Lynd LR, Cushman JH, Nichols RJ, Wyman C E. Fuel ethanol from cellulosic biomass. *Science (Washington)*. 1991;251(4999):1318–1323.

Mabee WE, Gregg DJ, Saddler JN. Assessing the emerging biorefinery sector in Canada. In Twenty-Sixth Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. *Humana Press. Jan*. 2005:765–778.

Maitan-Alfenas GP, Visser EM, Guimarães VM. Enzymatic hydrolysis of lignocellulosic biomass: converting food waste in valuable products. *Current Opinion in Food Science*. 2015;1:44–49.

Maldonado HG, Lopez OP. Amylolytic enymes and products derived from starch: a review. Critical Reviews in Food. *Science and Nutrition*. 1995;35(5):373–402.

Margeot A, Hahn-Hagerdal B, Edlund M, Slade R, Monot F. New improvements for lignocellulosic ethanol. *Current Opinion in Biotechnology*. 2009;20(3):372–380.

Matsushika A, Inoue H, Kodaki T, Sawayama S. Ethanol production from xylose in engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains: current state and perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2009;84(1):37–53.

Matsushika A, Watanabe S, Kodaki T, Makino K, Sawayama S. Bioethanol production from xylose by recombinant *Saccharomyces cerevisiae* expressing xylose reductase, NADP+-dependent xylitol dehydrogenase, and xylulokinase. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2008;105(3):296–299.

Menon V, Rao M. Trends in bioconversion of lignocellulose: biofuels, platform chemicals & biorefinery concept. *Progress in Energy and Combustion Science*. 2012;38(4):522–550.

Nagodawithana TW, Steinkraus KH. Influence of the rate of ethanol production and accumulation on the viability of *Saccharomyces cerevisiae* in" rapid fermentation". *Applied and Environmental Microbiology*. 1976;31(2):158–162.

Naik SN, Goud VV, Rout PK, Dalai AK. Production of first and second generation biofuels: a comprehensive review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2010;14(2):578–597.

Nakafi MF, Deobagkar D. Purification and characterization of an extracellular a-amylase from *Bacillis subtilis* ax20. *Protein Expression and Purification*. 2005;41:349–354.

Noraini MY, Ong HC, Badrul MJ, Chong WT. A review on potential enzymatic reaction for biofuel production from algae. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2014;39:24–34.

Nova Cana. 2015. http://www.novacana.com/etanol/funcionamento-usina-destilaria/. Acesso em outubro de 2015.

Okeke BC. Cellulolytic and Xylanolytic Potential of High β-Glucosidase-Producing Trichoderma from Decaying Biomass. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2014;174(4):1581–1598.

Parajó JC, Domínguez H, Domínguez J. Biotechnological production of xylitol. Part 1: Interest of xylitol and fundamentals of its biosynthesis. *Bioresource Technology*. 1998;65(3):191–201.

Park JH, Yoon JJ, Park HD, Lim DJ, Kim SH. Anaerobic digestibility of algal bioethanol residue. *Bioresource Technology*. 2012;113:78–82.

Paulová L, Patáková P, Branská B, Rychtera M, Melzoch K. Lignocellulosic ethanol: Technology design and its impact on process efficiency. *Biotechnology Advances*. 2014.

Pereira Jr N. Investigation of D-xylose fermenting yeast. Ph.D. Thesis. Department of Chemistry. *The University of Manchester*. 1991.

Pereira Jr N, Couto MAPG, Santa Anna LMM. Biomass of lignocellulosic composition for fuel ethanol production and the context of biorefinery. *Series on Biotechnology*. 2008;2:2–45.

Pereira MC, Alquini F, Günther WMR. Fertirrigação com vinhaça, aspectos técnicos, ambientais e normativos. Anais do XVIII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos. *Campo Grande, MS*. 2009.

Phitsuwan P, Sakka K, Ratanakhanokchai K. Improvement of lignocellulosic biomass in planta: A review of feedstocks, biomass recalcitrance, and strategic manipulation of ideal plants designed for ethanol production and processability. *Biomass and Bioenergy*. 2013;58:390–405.

Querol A, Fernández-Espinar MT, Barrio E. Adaptive evolution of wine yeast. *International Journal of Food Microbiology*. 2003;86(1):3–10.

Quiroz-Castañeda RE, Folch-Mallol JL. Plant cell wall degrading and remodeling proteins: current perspectives. *Biotechnol Appl*. 2011;28:205–215.

Rajkumar R, Yaakob Z, Takriff MS. Potential of Micro and Macro Algae for Biofuel Production: A Brief Review. *Bioresources*. 2013;9(1):1606–1633.

Riesenberg D, Guthke R. High-cell-density cultivation of microorganisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1999;51(4):422–430.

Rocha V. Caracterização proteômica, identificação de proteínas acessórias e avaliação do potencial hidrolítico de um preparado celulásico obtido a partir de bagaço de cana por *Trichoderma harzianum* visando à aplicação na produção de etanol 2G. Tese (Doutorado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos), Escola de Química. *Universidade Federal do Rio de Janeiro*. 2014.

Roehr M. The biotechnology of ethanol: classical and future applications. *Vch Verlagsgesellschaft Mbh*. 2001.

Romano AH. Microbial sugar transport systems and their importance in biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 1986;4(8):207–213.

Ruis H, Schüller C. Stress signaling in yeast. *Bioessays*. 1995;17(11):959–965.

Saritha M, Arora A, Lata. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Substrates for Enhanced Delignification and Enzymatic Digestibility. *Indian J Microbiol*. 2012;52(2):122–130.

Saxena RC, Adhikari DK, Goyal HB. Biomass-based energy fuel through biochemical routes: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2009;13(1):167–178.

Shin SJ, Han SH, Park JM, Cho NS. Monosaccharides from industrial hemp (*Cannabis sativa* L.) woody core pretreatment with ammonium hydroxide soaking treatment followed by enzymatic saccharification. *Journal of Korea Technical Association of The Pulp and Paper Industry*. 2009;41(5):15–19.

Soccol CR, de Souza Vandenberghe LP, Medeiros ABP, Karp SG, Buckeridge M, Ramos LP, Torres FAG. Bioethanol from lignocelluloses: status and perspectives in Brazil. *Bioresource Technology*.

2010;101(13):4820–4825.
Sticklen MB. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol. *Nature Reviews Genetics*. 2008;9(6):433–443.
Surmely R. Produção dos hidrolisados a partir da mandioca por processos enzimáticos. Botucatu: Ministério das Ciências e Tecnologias. Programa RHAE/CNPq, CERAT/UNESP. *Universidade Estadual Paulista*. 1997:124.
Tadesse H, Luque R. Advances on biomass pretreatment using ionic liquids: An overview. *Energy Environmental Science*. 2011;4(11):3913–3929.
Taherzadeh JM, Karimi K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: a review. *Int J Mol*. 2008;9:1621–1651.
Toivola A, Yarrow D, Van Den Bosch E, Van Dijken JP, Scheffers WA. Alcoholic fermentation of D-xylose by yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*. 1984;47(6):1221–1223.
Tseng CK. Algal biotechnology industries and research activities in China. *Journal of Applied Phycology*. 2001;13(4):375–380.
Tuite MF, Oliver SG. vol. 4 *Saccharomyces*. Biotechnology Handbooks; 1991.
Uhlig H. *Application of technical enzyme preparations: Enzymes in the starch and sugar industries: In: Industrial Enzymes and their Applications*. New York: John Wiley & Sons Inc; 1998:224–254.
Van Dyk JS, Pletschke BI. A review of lignocellulose bioconversion using enzymatic hydrolysis and synergistic cooperation between enzymes – factors affecting enzymes, conversion and synergy. *Biotechnology Advances*. 2012;30(6):1458–1480.
Wang Q, Wang X, Wang X, Ma H. Glucoamylase production from food waste by *Aspergillus niger* under submerged fermentation. *Process Biochemistry*. 2008;43(3):280–286.
Webb SR, Lee H. Regulation of D-xylose utilization by hexoses in pentose-fermenting yeasts. *Biotechnology Advances*. 1990;8(4):685–697.
Wolverton BC, Mcdonald RC. The water hyacinth from prolific pest to potencial provider. *AMBIO*. 1979;8(1).
Wood TM, Saddler JN. Increasing the availability of cellulose in biomass materials. *Methods in Enzymology*. 1988;160:3–11.
Wyman CE, Dale BE, Elander RT, Holtzapple M, Ladisch MR, Lee YY. Coordinated development of leading biomass pretreatment technologies. *Bioresource Technologt*. 2005;96:1959–1966.
Yoon SY, Han SH, Shin SJ. The effect of hemicelluloses and lignin on acid hydrolysis of cellulose. *Energy*. 2014;77:19–24.
Zheng Y, Pan Z, Zhang R. Overview of biomass pretreatment for cellulosic ethanol production. *International Journal of Agricultural and Biological Engineering*. 2009;2(3):51–68.

[1]Biorrefinarias são similares às refinarias de petróleo em conceito; no entanto estas concepções tecnológicas utilizam biomassa (em oposição ao petróleo e outras fontes fósseis) para produzir combustíveis para transporte, uma variedade de substâncias químicas e energia. Biorrefinarias industriais têm sido identificadas como as rotas mais promissoras para a criação e uma nova indústria baseada em fontes renováveis.

CAPÍTULO 11

Produção Biotecnológica de Antibióticos

Ângelo Samir Melim Miguel

Tatiana Souza Porto

Conceitos apresentados neste capítulo

Os antimicrobianos são moléculas importantes dentro da microbiologia industrial, pois estão relacionadas com o tratamento de doenças causadas por microorganismos. Este capítulo abordará de forma simplificada o histórico, a ação e aplicação, a produção e evolução de alguns dos principais antimicrobianos de uso clínico.

11.1. Introdução

No início, o tratamento de infecções era dominado pela aplicação de produtos naturais e seus variantes semissintéticos. Assim, o termo antibiótico foi definido como sendo substâncias produzidas por diversas espécies de micro-organismos capazes de inibir o crescimento de outros micro-organismos, podendo eventualmente destruí-los. Contudo, o termo antibiótico é comumente estendido às substâncias sintéticas que também são capazes de exercer essas funções (Chambers e Sande, 1996a; White, 2012). O termo antibiótico foi atualizado, sendo definido como: moléculas capazes de inibir o crescimento ou destruir fungos ou bactérias. Aqueles com atividade inibitória são chamados de bacteriostáticos, enquanto os que destroem os micro-organismos são chamados de bactericidas (Masurekar, 2009).

Os antibióticos podem ser obtidos através de síntese química ou biotecnológica, ou mesmo da utilização de ambas as técnicas. A via de produção biotecnológica, que teve início com o desenvolvimento do processo de produção de penicilina em 1940, tem crescido e ganhado importância, principalmente no que tange à pesquisa e desenvolvimento de novas moléculas antimicrobianas, bem como de micro-organismos capazes de produzi-las. Portanto a produção biotecnológica de antibióticos é o foco deste capítulo, o qual irá explorar o processo de desenvolvimento, produção e inovação de algumas das principais classes desses antibióticos.

11.2. Histórico

A história dos antibióticos remonta à utilização de metais pesados, como o mercúrio e bismuto, para o tratamento da sífilis. O uso do mercúrio para terapia da sífilis foi discutido pela primeira vez em 1400 e, devido à falta de estudos sistemáticos naquela época, hoje não se sabe ao certo se foram eficazes ou não (Shlaes, 2010). Embora as bactérias tenham sido observadas em microscópio pela primeira vez por volta de 1670 por Leewenhoek, a ideia de que elas pudessem ser causadoras de infecções ocorreu somente no século XIX, a partir de observações de Pasteur e Koch. Louis Pasteur observou que determinadas cepas bacterianas eram importantes para processos fermentativos, enquanto Robert Koch acabava por identificar os micro-organismos responsáveis por causar doenças, como tuberculose, cólera e febre tifoide (Patrick, 1995). Nesse período, o estudo contra doenças infecciosas contava com métodos como vacinação, bem como pesquisa de agentes antimicrobianos eficientes. Foi então que, em 1908, Paul Ehrlich desenvolveu o primeiro antimicrobiano puramente sintético derivado do arsênico, o solvarsan, o qual em 1910 foi comercializado e empregado no tratamento da sífilis. Contudo, o uso da droga era limitado devido à sua toxicidade (Shlaes, 2010; Patrick, 1995). O segundo a ser desenvolvido foi a proflavina em 1934, amplamente utilizada no tratamento de infecções em ferimentos durante a II Guerra Mundial. No entanto, por apresentar alta toxicidade, não pôde ser utilizado no tratamento de infecções sistêmicas, ficando evidente a necessidade de agentes mais eficazes (Guimarães *et al.*, 2010).

Em 1935, Gerhard Domagk sintetizou o prontosil, uma pró-droga que, depois de metabolizada, liberava o composto ativo sulfonamida. Esse antibiótico deu origem à classe das sulfonamidas, ou sulfas, como são conhecidas, representando um grande avanço na terapêutica, pois eram os primeiros medicamentos eficazes contra infecções bacterianas sistêmicas (Fernandes, 2006; Shades, 2010, Patrick, 1995). A Figura 11.1 ilustra, resumidamente, a linha do tempo das principais descobertas de antibióticos.

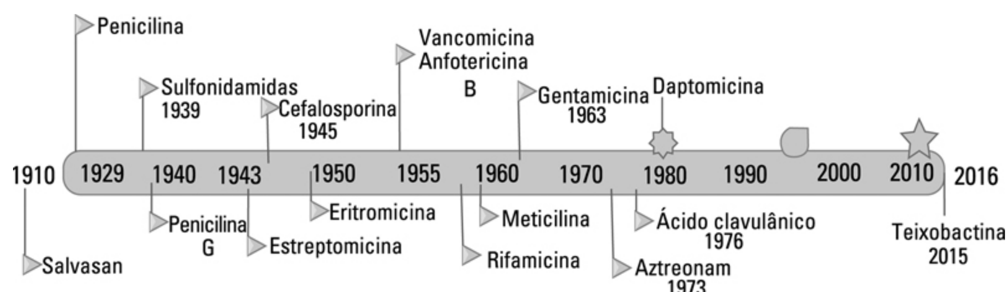


FIGURA 11.1 **Linha do tempo da produção de antimicrobianos.**

Em 1929, Alexander Fleming observou que um fungo contaminante foi capaz de provocar a lise de estafilococos em placas de ágar, cujas colônias apresentavam-se translúcidas. A partir de seus estudos, Fleming verificou que a penicilina, como foi chamada, apresentava uso potencial para tratamento de infecções (Fleming, 1929). A continuidade dessa pesquisa foi feita por Florey e Chain, eles obtiveram um extrato

bruto contendo a penicilina, a qual foi testada clinicamente e com resultados satisfatórios, tornando-se clinicamente disponível em 1942 (Oliveira *et al.*, 2009).

A descoberta da penicilina, um antibiótico natural, mudou o cenário da terapêutica contra doenças infecciosas, e sua industrialização no início dos anos 1940 teve um grande papel no tratamento das forças armadas dos Estados Unidos durante a Segunda Guerra Mundial (Figura 11.2) (Riley, 1972). Muitos estudos se intensificaram nos anos subsequentes para obtenção de novos antimicrobianos, foram realizadas várias triagens com diferentes micro-organismos visando à produção desses compostos. Nestes estudos, vários antibióticos β-lactâmicos produzidos por processos fermentativos foram descobertos, como a estreptomicina em 1943, por Waksman e colaboradores, utilizando uma cepa de *Streptomyces griseus*. A estreptomicina apresentava efetividade contra bactérias Gram-negativas e contra *Mycobacterium tuberculosis*, inovando o tratamento contra a tuberculose (Ebrahim *et al.*, 2010). O aparecimento da resistência microbiana aos antimicrobianos foi, e provavelmente continuará sendo, um dos grandes problemas da medicina, tendo como causa a mutação espontânea e recombinação de genes, responsáveis pela variabilidade genética, possibilitando que a seleção natural proporcione vantagens aos micro-organismos e, neste caso, os antimicrobianos atuam como agentes seletivos.



FIGURA 11.2 Pôster do Governo Federal dos Estados Unidos, publicado durante a Segunda Guerra Mundial, que retrata a importância da penicilina durante a guerra. *Fonte*: Wikimedia

O termo resistente se refere àqueles micro-organismos que não são inibidos por concentrações padrão dos antimicrobianos, ou àqueles que apresentam mecanismos de resistência específicos para o agente antimicrobiano utilizado (Mota *et al.*, 2005). A partir do processo de industrialização da produção de antibióticos, seguiu-se uma grande evolução na descoberta e desenvolvimento de novos antimicrobianos,

principalmente através de isolamentos de micro-organismos, triagem em coleções de culturas e genômica. Assim, cada vez mais, novos antibióticos naturais, biossintéticos ou semissintéticos ganharam mercado, perfazendo alguns dos principais grupos de antimicrobianos biotecnologicamente obtidos, como penicilinas, tetraciclinas, macrolídeos, aminoglicosídeos, cefalosporinas, cloranfenicol, glicopeptídeos e rifamicinas, os quais têm sido amplamente usados na terapêutica atual.

11.3. Classes

Os antibióticos podem ser classificados de diferentes formas, como a partir de sua estrutura química, tipos de germes sobre os quais atuam, bem como seu efeito. A Tabela 11.1 resume as principais classes de antibióticos segundo sua estrutura química, apresentando exemplos, mecanismo de ação e fonte do antibiótico em questão.

Tabela 11.1

Classificação dos antibióticos segundo sua estrutura química, exemplos, mecanismo de ação e obtenção dos antibióticos

Classe	Subclasse	Exemplo	Alvo	Mecanismo de ação	Obtenção/Origem
Derivados de aminoácidos					
Monopeptídeos		Cicloserina	Análogo estrutural de D-alanina	Inibição da síntese correta da parede celular	*Streptomyces orchidaceus* ou síntese
Anfenicois		Cloranfenicol	Subunidade 50S ribossomal	Inibição de síntese proteica	*Streptomyces venezuela* e síntese
β-Lactâmicos	Penamas	Penicilinas	Enzima transpeptidase	Inibição da síntese correta da parede celular	*Penicillium chrysogenum, Acremonium chrysogenum*
	Penemas	Ritipeném			Semissintético
	Carbapenemas	Tienamicina			Semissintético
	Cefemas	Cefalosporinas			Semissintético
	Monobactâmicos	Aztreonam			*Chromobacterium violaceum*
	Inibidores de β-lactamase	Ácido clavulânico	β-lactamase	Inibição enzimática da enzima β-lactamase	*Streptomyces clavuligerus*
Glicopeptídeos		Vancomicina	Peptídeo terminal D-Ala-D-Ala	Inibição da síntese correta da parede celular	*Streptomyces orientalis*
Lipopeptídeos	Daptomicina		Membrana celular	Despolarização da membrana, inibição da síntese de proteínas, ácidos nucleicos, extravasamento de conteúdo citoplasmático e morte bacteriana	*Streptomyces roseosporus*
	Equinocandinas	Caspofungina	Enzima ligada à síntese de β (1,3) D glucana	Inibição da síntese da parede celular	Semissintético
Derivados de açúcares					
Heterosídeos macrolídeos		Eritromicina	Receptores na subunidade ribossômica 50S	Inibição da síntese proteica	*Streptomyces erythreus*
	Azalidas	Azitromicina			Semissintético
	Cetolídeos	Telitromicina			Semissintético
Lincosamidas		Lincomicina	Receptores na subunidade ribossômica 50S	Inibição da síntese proteica ou produção de proteínas defeituosas	*Streptomyces lincolmensis*
Aminoglicosídeos		Estreptomicina	Receptores na subunidade ribossômica 30S	Inibição da síntese proteica	*Streptomyces griseus*
Estreptograminas		Quinupristina	Receptores na subunidade ribossômica 50S	Inibição da síntese proteica	Semissintético
Derivados de acetatos propionatos					

Classe	Subclasse	Exemplo	Alvo	Mecanismo de ação	Obtenção/Origem
Poliênios		Anfotericina B	Ergosterol da membrana celular	Formação de poros e aumento da permeabilidade celular	*Streptomyces nodosus*
Aromáticos	Tetraciclinas	Clortetraciclina	Receptores na subunidade ribossômica 30S	Inibição da síntese proteica	*Streptomyces aureofasciens*
	Glicilciclinas	Tigeciclina	Receptores na subunidade ribossômica 30S	Inibição da síntese proteica	Síntese
	Rifamicinas	Rifampicina	RNA-polimerase	Inibição da síntese de RNA	Semissintético
Esteroides		Ácido fusídico	Fator de alongamento G a nível ribossomal	Inibição da síntese proteica	*Fusidium coccineum*
Derivados do grisano		Griseofulvina	Microtúbulos	Desorganização do fuso mitótico	*Penicillium griseofulvus*
Outros					
Fosfomicina			Competição com enzima piruvil-transferase	Inibição da síntese da parede celular	*Streptomyces fradie* ou síntese

Fonte: Tavares (2007), Chambers *et al.* (1996a), Guimarães *et al.* (2010), Waites *et al.* (2001), Kern (2006), Martinez (2006), Vasconcelos *et al.* (2006), Spížek e Řezanka (2004), Allington e Rivey (2001), Greer (2006), Zomorodian *et al.* (2007), Mandell e Petri Jr (1996a), Mandell e Petri Jr (1996b), Chambers e Sande (1996b), Kapusnik-Uner e Sande (1996), Bennett (1996).

11.4. Produção de antibióticos

11.4.1. β-lactâmicos

A principal característica compartilhada por todos os compostos β-lactâmicos é o anel azetidinona de quatro membros, ou anel β-lactâmico. Este anel pode apresentar-se isolado, como é o caso particular dos monobactâmicos, mas, em geral, encontra-se ligado a outro anel de cinco (tiazolidínico) ou de seis (hidrotiazínico) membros, formando as penicilinas e cefalosporinas, respectivamente. Os antibióticos classificados como β-lactâmicos são subdivididos em grupos de acordo com sua estrutura química: penicilinas, cefalosporinas e cefamicina, carbapeninas, monobactamas e as clavanas (Häbich e Nussbaum, 2006).

Os β-lactâmicos atuam inibindo as enzimas bacterianas transpeptidase, carboxipeptidase e endopeptidase, que em Gram-positivas estão localizadas na parede formada por peptideoglicanos. Já nas bactérias Gram-negativas entre a camada de peptideoglicano e a membrana citoplasmática confina-se o espaço periplásmico, e as enzimas alvo dos β-lactâmicos encontram-se na parte externa da membrana plasmática. As enzimas transpeptidases são denominadas de "PBP" (*Penicilin Binding Proteins*), deste modo a sua inibição previne o desenvolvimento da estrutura de peptideoglicano, pois estas enzimas estão envolvidas na criação da ligação cruzada entre as cadeias peptídicas (Murray *et al.*, 2005).

As bactérias que são capazes de inativar os antimicrobianos β-lactâmicos utilizam quatro mecanismos principais, sendo que o mais comum deles utiliza as enzimas β-lactamases para a destruição do antibiótico ou ainda podem modificar grupos funcionais farmacologicamente importantes presentes na estrutura, criando estruturas inativas para o reconhecimento molecular. Este mecanismo de resistência está presente em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Silveira *et al.*, 2006).

Outro mecanismo de resistência caracteriza-se pelo efluxo contínuo do antibiótico para o exterior da célula devido à expressão de proteínas transportadoras de membrana, que são responsáveis pelo fluxo de entrada e saída de substâncias, deste modo fazendo com que a saída do antimicrobiano para o meio extracelular aconteça mais rapidamente que a sua entrada, mantendo níveis insuficientes para atuação do antibiótico sobre as funções celulares. A bomba de efluxo é o mecanismo de resistência encontrado em espécies de *Pseudomonas* e em outras bactérias Gram-negativas. A modificação da estrutura-alvo do antibiótico pode acontecer como mecanismo de resistência, pela modificação de genes que expressam os antimicrobianos, impossibilitando o reconhecimento do fármaco pelo alvo ou diminuindo a sua potência (Silveira *et al.*, 2006; Wilke *et al.*, 2005). Exemplos de alvo e ação dos antimicrobianos, bem como mecanismos de resistência, podem ser observados na Figura 11.3.

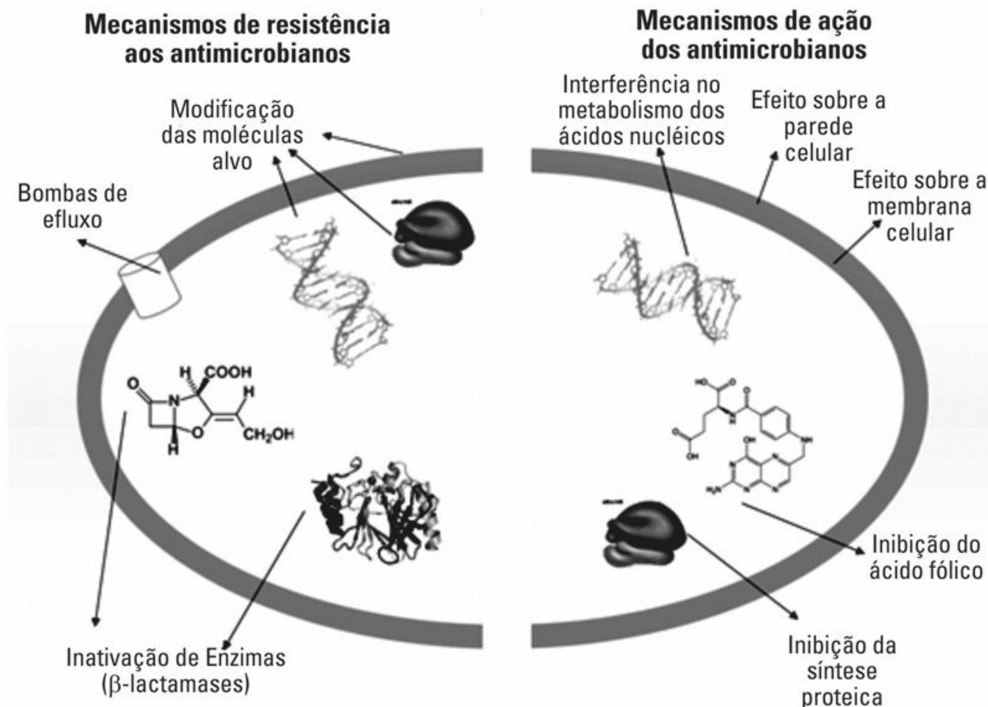


FIGURA 11.3 Principais alvos dos antimicrobianos e os mecanismos de resistência. *Fonte*: Adaptado de Wright (2010).

Os β-lactâmicos são amplamente utilizados na terapêutica, perfazendo cerca de 65% do mercado mundial de antibióticos, cuja movimentação foi estimada em torno de US$15 bilhões, com as penicilinas perfazendo US$5 bilhões e cefalosporinas US$9,9 bilhões (Elander, 2003).

11.4.1.1. Penicilinas

A implementação e o desenvolvimento do processo de produção da penicilina foram bem conturbados, tendo sido produzida industrialmente somente mais de uma década após seu descobrimento. Florey e colaboradores realizaram estudos detalhados sobre a penicilina. Foi verificada sua baixa toxicidade e eficiência como antimicrobiano em ratos e, posteriormente, foram conduzidos testes em humanos. A produção da penicilina ocorreu nos Estados Unidos da América por volta de 1940, produto de grande esforço e cooperação entre universidades e laboratórios industriais na Inglaterra e nos Estados Unidos que durou durante toda a Segunda Guerra Mundial (Demain e Elander, 1999).

Como a produção de penicilina pela cepa isolada por Fleming era muito baixa, esforços foram feitos para isolamento de cepas visando aumento da produção, como *Penicillium chrysogenum* NRRL 1951, que era capaz de produzir cerca de 60 μg/mL. A partir de melhoramentos genéticos, como radiação ultravioleta e raios-X, por exemplo, conseguiu-se desenvolver na Universidade de Wisconsin uma cepa que era capaz de produzir 1800 mg/mL do antibiótico, sendo essas cepas uma das mais conhecidas em todo o mundo. Em 1945, pelo trabalho desenvolvido sobre a penicilina Fleming, Chain

e Florey receberam o prêmio Nobel da medicina (Raper, 1946; Demain e Elander, 1999; Backus e Stauffer, 1995).

As penicilinas, em geral, compartilham o mesmo núcleo básico, o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA), formado pela fusão do anel β-lactâmico e um tiazolidínico. Dependendo do ligante na cadeia lateral (R), diferentes penicilinas podem ser originadas, enquanto que a ação antimicrobiana se deve ao anel β-lactâmico (Figura 11.4). O 6-APA é amplamente essencial para o desenvolvimento de penicilinas semissintéticas, as quais apresentam propriedades diversas, como maior solubilidade ou resistência à ação da enzima β-lactamase, a qual é capaz de inativar o antibiótico (Tavares, 2007).

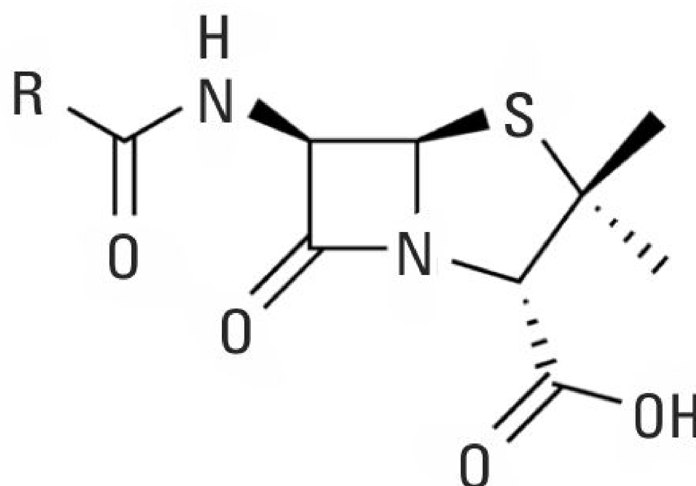


FIGURA 11.4 **Estrutura química do ácido 6-aminopenicilânico.**

A biossíntese das penicilinas é um processo enzimático que ocorre em três etapas. Inicialmente ocorre uma condensação entre o ácido L-*α*-aminodípico, L-cisteína e L-valina, catalisada pela N-(5-amino-5-carboxipentanoill)-L- -cisteinil-D-valina sintase, resultando no tripeptídeo δ-(L-a-aminodipil)-L-cisteinil-D-valina que, por sua vez, é convertido a isopenicilina N pela ação da enzima isopenicilina N sintase. Nessa etapa é formado o anel β-lactâmico tiazolidínico, o qual confere à molécula a atividade antimicrobiana. Por fim, a enzima ácido 6-aminopenicilânico aciltransferase é responsável por promover a troca da porção aminodipil da isopenicilina N por uma cadeia lateral específica (Figura 11.5) (Muller *et al.*, 1991).

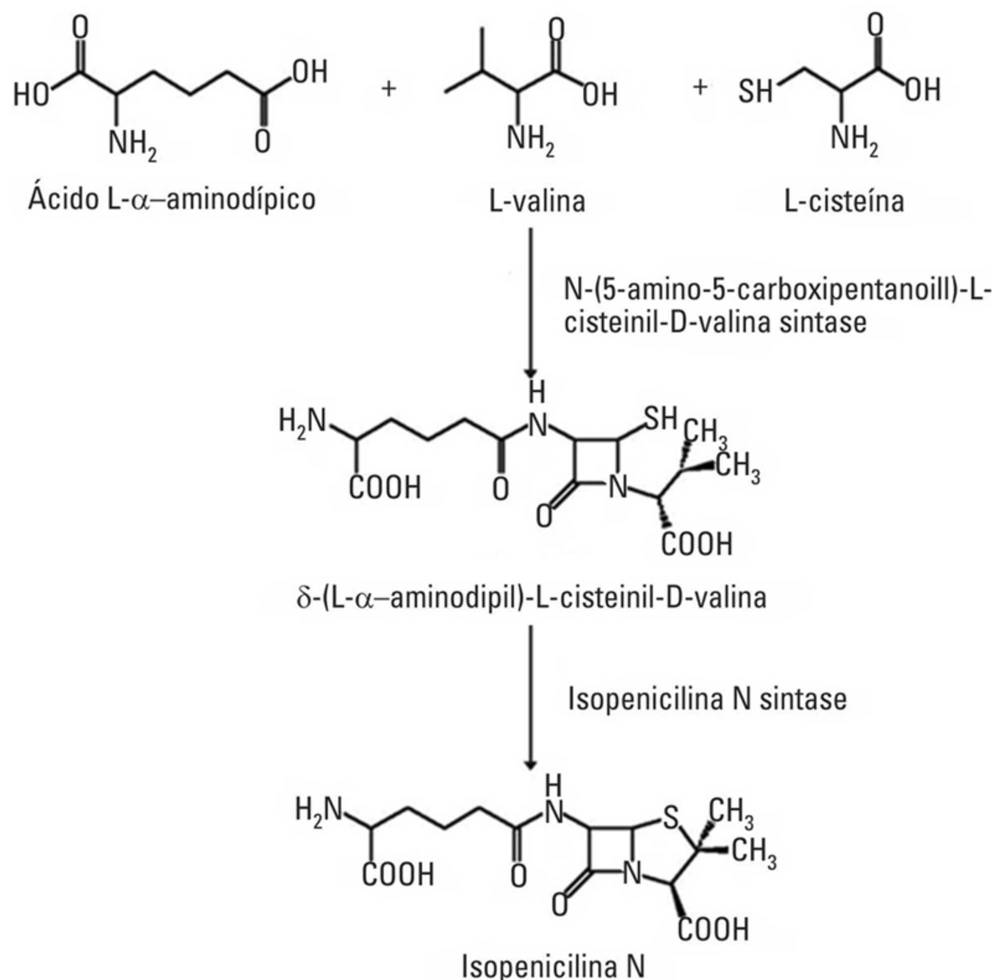


FIGURA 11.5 Biossíntese da isopenicilina N. *Fonte*: Adaptado de Weber *et al*. (2012).

A produção das penicilinas G e V tem sido conduzida por processo descontínuo alimentado, de forma asséptica, em biorreatores de tanque agitado de 40.000 a 200.000 L, com tempo de produção variando de 120 a 200 h. O processo apresenta duas fases, a de crescimento vegetativo (dois dias), seguido da fase de alimentação, na qual ocorre produção do antibiótico (seis a oito dias). Um fator importante no processo é a aeração, cujos níveis de oxigênio devem ser mantidos entre 25 e 60 mmol/L/h. Esse nível de aeração pode ser um desafio, pois a taxa de transferência de oxigênio reduz com o aumento da viscosidade, que por sua vez aumenta com a formação de biomassa durante a fermentação. Os valores de temperatura e de pH podem variar em condições específicas, contudo giram em torno de 25-27°C e 6,5-7,7, respectivamente (Waites *et al.*, 2001).

Diferentes fontes de carbono foram adotadas para a produção de penicilina, tais como a glicose, lactose, sacarose, etanol e óleos vegetais, assim como água de maceração de milho, como fonte de nitrogênio. Em se tratando de um metabólito secundário, o processo de produção da penicilina sofre influência de componentes específicos presentes no meio de cultivo, como ácido fenil acético e ácido fenoxiacético, precursores das penicilinas G e V, respectivamente (Figura 11.6) (Van Nistelrooij *et al.*, 1998; Waites *et al.*, 2001, Elander, 2003). Embora outras penicilinas também possam ser

produzidas naturalmente, como a F, G, K, O, X, e V, por exemplo, apenas as penicilinas G e V têm aplicação médica devido à sua maior atividade em relação às demais (Tavares, 2007). Esses precursores podem apresentar toxicidade para o micro-organismo, por esse motivo, a alimentação contínua acaba por ser uma estratégia interessante para manter suas concentrações abaixo da considerada inibitória (Waites *et al.*, 2001).

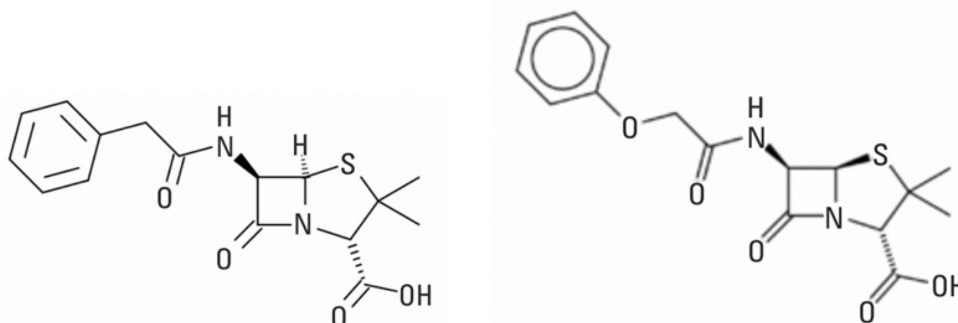


FIGURA 11.6 Estrutura química das penicilinas G e V.

Como a penicilina é excretada para o meio de cultivo, os processos de recuperação têm início com a remoção do micélio em tambor rotativo a vácuo. Em seguida é feita extração com solventes, enquanto os pigmentos são removidos por tratamento com carvão ativado. A penicilina então é precipitada como sais de sódio ou potássio através da adição de acetato de sódio ou potássio. Na sequência, um novo tratamento com solventes é feito para eliminação das impurezas e posterior secagem, chegando a alcançar 95% de pureza (Waites *et al.*, 2001).

Quanto à sua ação antimicrobiana, em geral, as penicilinas apresentam atividade contra bactérias Gram-positivas, cocos Gram-negativos, espiroquetas e actinomicetos, com boa ação contra β-hemolíticos (Tavares, 2007).

Embora a produção de penicilinas por processos fermentativos tenha suas limitações, muitas outras podem ser obtidas a partir de síntese, as quais chamamos de penicilinas semissintéticas. Essas sínteses, em geral, são realizadas partindo do 6-APA, que por sua vez é proveniente da hidrólise da penicilina G pela enzima penicilina G acilase imobilizada (Volpato *et al.*, 2010; Lowe, 2001). Essas penicilinas semissintéticas representaram um grande avanço, pois as mudanças impostas na estrutura lhes conferem diferentes propriedades, como variação no espectro de ação, absorção e resistência à ação das β-lactamases (Tabela 11.2).

Tabela 11.2

Exemplos da estrutura química de algumas penicilinas semissintéticas e suas principais características quanto à atividade

Penicilinas semissintéticas	Características
Amoxicilina	Largo espectro de ação.
Cloxacilina	Pequeno espectro de ação e resistente à ação da penicilinase. Ação antiestafilocócicas.

Penicilinas semissintéticas	**Características**
Ticarcilina	Penicilina antipseudomonas.

Penicilinas semissintéticas	Características
Azlocilina	Amplo espectro de ação.

Fonte: Informações das características obtidas de Tavares (2007).

11.4.1.2. Cefalosporinas

Em 1945, Giuseppe Brotz (professor de Higiene da Universidade de Cagliari, Itália) descobriu que o extrato de *Cephalosporium acremonium*, hoje conhecido como *Acremonium chysogenum*, apresentava atividade contra bactérias Gram-positivas e negativas. Estudos subsequentes mostraram a existência de diferentes compostos ativos nesse extrato, sendo a cefalosporina C a mais importante no processo de desenvolvimento da antibioticoterapia dessa classe. Esse antibiótico chamou a atenção devido à sua resistência à penicilinase de *Bacillus subtilis* e por sua ação antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhi* e *Escherichia coli*. Em 1961 a sua estrutura básica foi confirmada como sendo um sistema heterocíclico β-lactâmico-dihidrotiazínico, o ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA) (Tavares, 2007; Muñiz *et al.*, 2007; Abraham e Newton, 1961) (Figura 11.7).

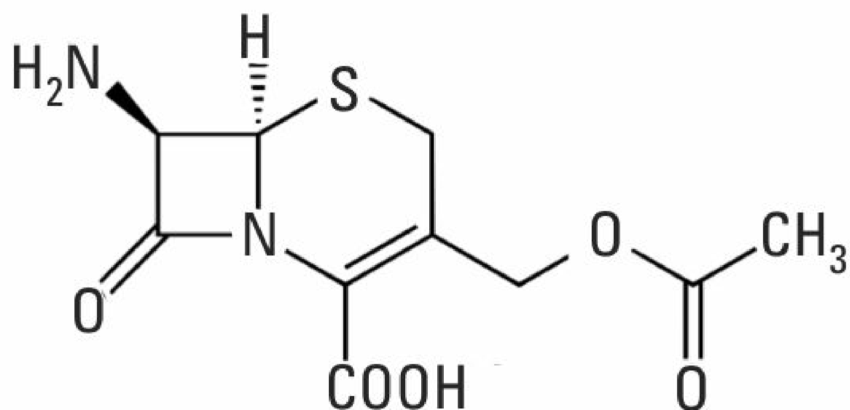


FIGURA 11.7 **Estrutura química do ácido 7-aminocefalosporânico.**

A biossíntese da cefalosporina C apresenta etapas similares às da penicilina, desde a condensação de L-α-aminoadípico ácido, L-cisteína e L-valina à formação da isopenicilina N (Figura 11.5) (Arnstein e Morris, 1960, Fawcett *et al.*, 1976, Elander, 2003). Conforme ilustrado pela Figura 11.8, na biossíntese de cefalosporina C, a isopenicilina N é convertida em penicilina N pela ação de um sistema enzimático formado por acil-CoA sintetase, acil-CoA racemase e tioesterase (Ullán et al., 2002, Knihinicki et al., 1991). A penicilina N é considerada a precursora direta de todas as cefalosporinas e cefamicinas, atuando como substrato para reações adicionais na biossíntese (Schmitt, 2004). A penicilina N, através da ação da deacetoxicefalosporina C sintetase, é convertida em deacetoxicefalosporina C (DAOC), na qual seu anel tiazolidínico de cinco lados é ampliado a um dihidrotiazolidínico de seis lados característico da classe das cefalosporinas. Na sequência, a DAOC é convertida a deacetilcefalosporina C (DAC) pela enzima deacetilcefalosporina C sintetase. Por fim, deacetilcefalosporina C acetiltransferase catalisa a transferência do grupamento acetil da acetil-Coa para a DAC, formando a cefalosporina C (Schmitt, 2004; Samson *et al.*, 1987).

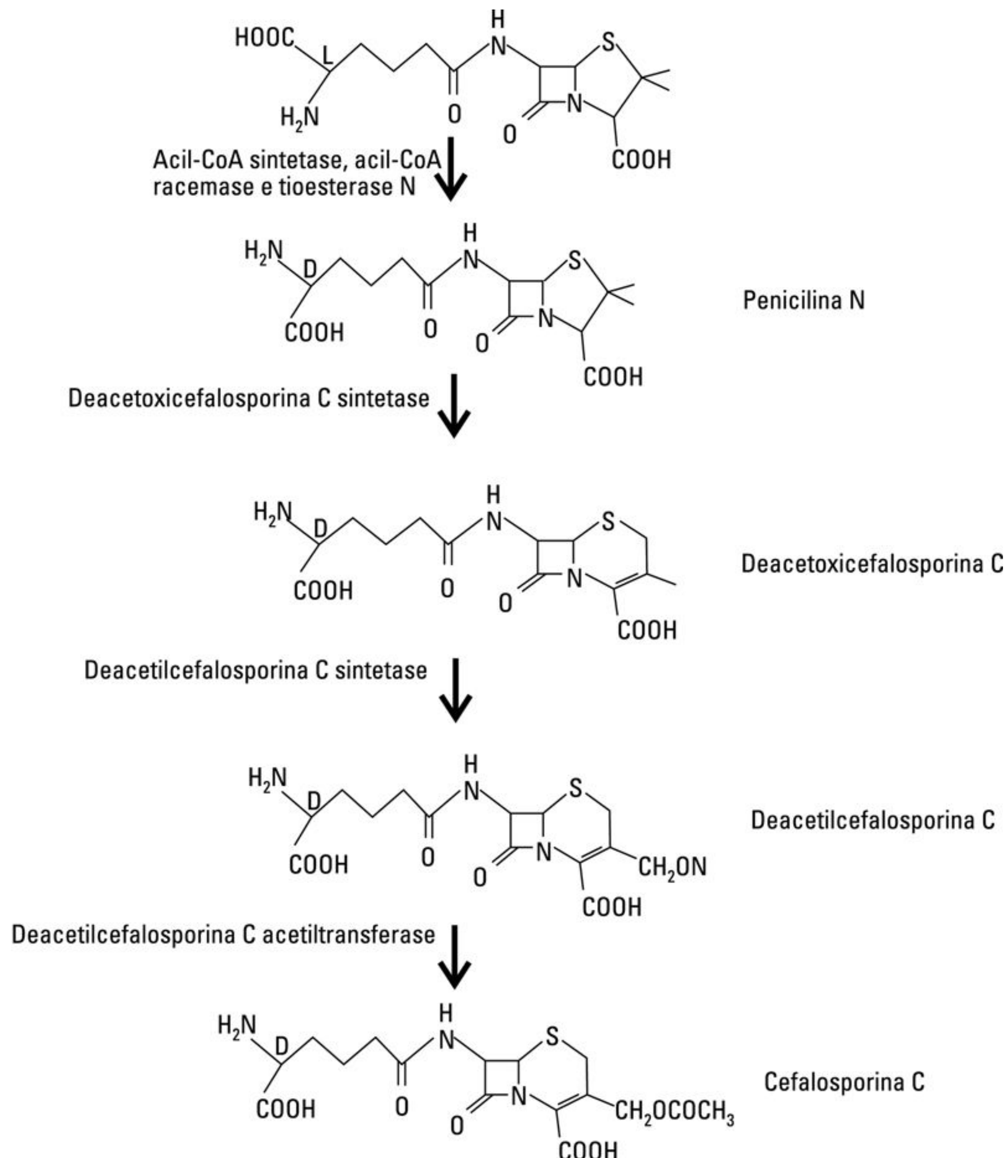


FIGURA 11.8 Biossíntese de cefalosporina C a partir da isopenicilina N. *Fonte*: Adaptado de Schmitt *et al.* (2004).

A produção industrial de cefalosporinas tem sido conduzida empregando cepas de *Acremonium chrysogenum* e processo fermentativo descontínuo alimentado, cuja produção gira em torno de 20 a 25 g/L. Durante a fase de crescimento celular, fontes de carbono simples ou complexas são adicionadas e, na sequência, substituídas por outra fonte de carbono altamente energética, como óleo de soja ou de amendoim. Dessa forma, o micélio vegetativo passa a artrósporos, fase na qual ocorre rápida produção de cefalosporina. Uma interessante fonte de nitrogênio utilizada no processo é água de maceração de milho, pois tem custo relativamente menor em relação a outras fontes e é rica em nutrientes (aminoácidos, vitaminas, dentre outros). Fontes de nitrogênio inorgânico como amônia e sulfato de amônio também podem ser usadas em combinação com fontes de nitrogênio orgânicas. Alguns fatores, como manutenção da

oxigenação em níveis adequados, adição de D-metionina, controle do pH (6,2-7) e temperatura (24-28°C) são importantes para a produção do antibiótico (Elander, 2003).

A recuperação e purificação da cefalosporina tem início com o resfriamento (3-5°C) do caldo fermentado e posterior filtração ou centrifugação para remoção da biomassa. Uma das estratégias de purificação consiste na utilização de carvão ativado ou resinas não iônicas, pois, devido à seletividade da matriz, a cefalosporina é preferencialmente adsorvida, reduzindo a contaminação com penicilina N e outras impurezas. A penicilina N adsorvida é então removida por uma etapa de acidificação (pH 2). Na sequência, o uso de resinas de troca iônica no processo aumenta a qualidade da recuperação da cefalosporina C (Elander, 2003). A fração rica em cefalosporina C é tratada com sulfato de zinco ou acetado de sódio ou potássio. Solventes aquosos podem ser empregados para precipitar o complexo salino formado que apresenta baixa solubilidade em água (Lowe, 2001). Outra estratégia de purificação é substituir o grupo amino da cadeia lateral α-amino adipil em C-7. Dois derivados produzidos podem ser cristalizados em meio aquoso ácido. Alternativamente, bases orgânicas, como diciclohexilamina ou dimetil-benzilamina, podem ser adicionadas aos derivados resultando em sais de cefalosporina que, na sequência, podem ser extraídos com solventes (Elander, 2003).

As cefalosporinas são antibióticos bactericidas, em geral têm amplo espectro e apresentam resistência contra determinadas β-lactamases, atuando de forma similar às penicilinas, inibindo a formação da parede celular (Mandell e Petri Jr., 1996a).

As cefalosporinas de uso clínico, em geral, são derivados semissintéticos do 7-ACA, o qual é obtido da hidrólise, química ou enzimática, da cefalosporina C. As modificações nas cadeias laterais (Figura 11.7) do 7-ACA deram origem a diversas cefalosporinas de uso clínico com diferentes propriedades. Outra forma de obtenção desses derivados é a partir da penicilina G que, após expansão do anel forma 7-ADCA (ácido 7-amino deacetoxicefalosporânico). Essa estratégia acaba por ser interessante devido ao baixo custo de produção da penicilina (Lowe, 2001; Tavares W., 2007; Elander, 2003). As primeiras cefalosporinas produzidas, também conhecidas como de primeira geração, foram a cefalotina, cefazolina, cefalexina, dentre outras. Estas apresentavam atividade contra bactérias Gram-positivas e negativas, resistência a β-lactamases estafilocócicas e sensibilidade a β-lactamases de Gram-negativas. As chamadas de segunda geração foram a cefuroxima, cefaclor, cefprozila e cefamicinas, como a cefoxitina. Essa geração de cefalosporinas apresenta espectro de ação mais amplo, bem como maior resistência às cefalosporinases, quando comparada à geração anterior. A terceira geração é marcada pelo desenvolvimento e produção da ceftriaxona, cefatoxima e ceftazidima, com maior potência contra micro-organismos Gram-negativos, maior resistência a cefalosporinases, e ainda apresentam a capacidade de alcançar concentração terapêutica no líquido cefalorraquidiano. As cefalosporinas de quarta geração, como a cefpiroma e cefepina, em geral apresentam alta atividade contra bactérias Gram-positivas e negativas, são consideradas pouco indutoras da produção de β-lactamases e resistentes à mesma (Mandell e Petri Jr., 1996a; Tavares, 2007). A ceftarolina fosamila, que tem sido considerada uma cefalosporina de quinta geração, apresenta amplo espectro de ação e uma importante atividade contra *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA- Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) (Duplessis *et al.*, 2011).

11.4.1.3. Ácido clavulânico

Com o surgimento de micro-organismos resistentes aos antibióticos, diferentes estratégias que visam superar a resistência adquirida por micro-organismos são de extremo interesse (Saudagar *et al.*, 2008). A modificação da estrutura do antimicrobiano para que a enzima β-lactamase não seja capaz de hidrolisar foi uma estratégia muito utilizada, ou ainda a inibição da enzima por um inibidor que apresente estrutura semelhante ao substrato β-lactâmico.

Em meados da década de 1960 iniciou-se no Beecham Research Laboratories estudos para seleção de novos micro-organismos produtores de compostos β-lactâmicos. Em 1976, Brown e colaboradores identificaram o ácido clavulânico (AC) como um produto do metabolismo secundário de *Streptomyces clavuligerus* (Saudagar *et al.*, 2008).

Os inibidores de β-lactamases são estruturalmente semelhantes às penicilinas, mas possuem uma cadeia lateral modificada (Figura 11.9), possibilitando assim a ligação irreversível às enzimas como substratos suicidas, mantendo-as inativas. O AC é classificado como um metabólito clavam e caracteriza-se por um núcleo bicíclico, formado por um anel de quatro membros fundido com um anel de oxazolidina de cinco membros. O AC apresenta uma substituição do enxofre por um oxigênio no anel tiazolidínico da penicilina formando um anel de oxazolidina no AC, um substituinte acilamino está ausente em C-6, e um grupo exo-β-hidroxietilideno é ligado em C-2, resultando num composto que inativa irreversivelmente as β-lactamases, ao invés de ser clivado pela enzima (Song *et al.*, 2010).

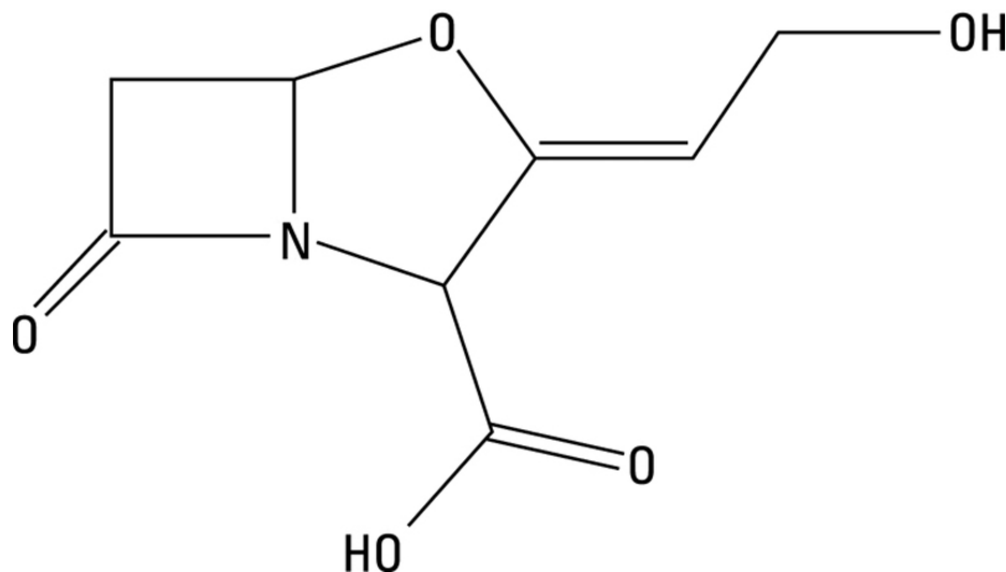


FIGURA 11.9 Estrutura química do ácido clavulânico.

Três tipos de inibidores de β-lactamases são normalmente utilizados na clínica médica, sulbactam, tazobactam e ácido clavulânico (Figura 11.10). O ácido clavulânico apresenta atividade inibidora de enzimas β-lactamase, que, de modo geral, foi um inibidor mais potente do que o sulbactam, e que o tazobactam foi significativamente mais potente do que o sulbactam (Payne *et al*,. 1994).

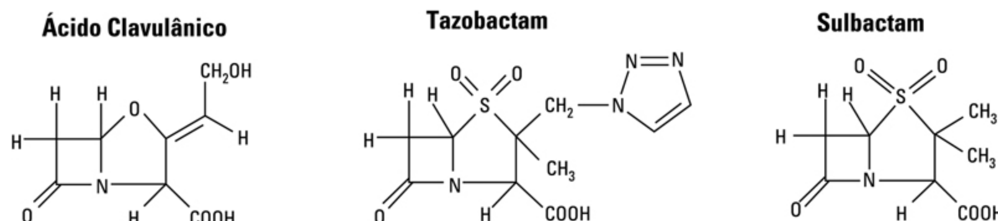


FIGURA 11.10 Estrutura química dos principais inibidores de β-lactamases.

Fonte: Adaptado de Williams (1999).

A capacidade de micro-organismos produzirem o AC parece ser mais restrita do que a capacidade para produção de antibióticos β-lactâmicos convencionais, uma vez que apenas espécies do gênero Streptomyces têm sido relatadas na literatura como produtoras de AC (Saudagar *et al.*, 2008).

O AC possui em sua estrutura o anel β-lactâmico típico dos antibióticos β-lactâmicos comumente utilizados como: penicilinas e cefalosporinas. No entanto, este composto apresenta baixa atividade antibiótica intrínseca. A similaridade química e estrutural do AC com outras moléculas β-lactâmicas permite-lhe atuar como inibidor competitivo das enzimas β-lactamases segregadas por algumas bactérias (Viana Marques *et al.*, 2011), por este motivo o AC é prescrito clinicamente em combinação com outros antibióticos. Na presença de baixas concentrações de AC, muitas bactérias produtoras de β-lactamases tornam-se sensíveis às penicilinas e cefalosporinas comercialmente disponíveis. Quando utilizado juntamente com outros antibióticos β-lactâmicos, ocorre uma ligação irreversível entre o grupo hidroxila da serina da β-lactamase e o AC, produzindo um intermediário estável, inativando a enzima e permitindo, assim, que o outro antibiótico atue no combate à infecção.

Industrialmente o AC é produzido por fermentação submersa da linhagem *S. clavuligerus*, o caldo fermentado obtido da fermentação passa por várias etapas de extração e purificação do AC, tais como: filtração e centrifugação para a separação das células, técnicas de extração e adsorção, para posterior purificação (Hirata *et al.*, 2009). Um dos métodos utilizados para a extração do AC é a técnica de extração líquido-líquido por solventes orgânicos. Após a remoção das células, adiciona-se ácido ao líquido metabólico para obter um pH entre 2-3 sob agitação. O ácido clavulânico extraído na fase orgânica é então novamente extraído com uma nova fase aquosa de pH neutro, para esta segunda extração são utilizadas soluções de bicarbonato de cálcio, carbonato de cálcio, tampão fosfato ou água. O líquido obtido é concentrado a pressão reduzida e liofilizado. Para a purificação do produto obtido nas etapas de extração várias técnicas já foram aplicadas, tais como, adsorção em resina de troca iônica, reações de esterificação e precipitação.

Revisão dos conceitos apresentados

Antibióticos são moléculas capazes de inibir o crescimento ou destruir fungos ou bactérias. Aqueles com atividade inibitória são chamados de bacteriostáticos, enquanto os que destroem os micro-organismos são chamados de bactericidas. Em geral a obtenção de antibióticos se dá através de síntese química ou por via biotecnológica, ou mesmo da utilização de ambas. A via de produção biotecnológica teve início com o desenvolvimento do processo de produção de penicilina em 1940,

enquanto um dos marcos da síntese química, em 1908, foi o desenvolvimento do solvarsan, usado no tratamento da sífilis. Uma das classes de antibióticos mais importantes e mais utilizadas na terapêutica é a dos β-lactâmicos, responsáveis por movimentar cerca de US$15 bilhões e corresponderem a 65% do mercado mundial de antibióticos. A principal característica compartilhada por todos os compostos β-lactâmicos é o anel β-lactâmico, o qual pode apresentar-se isolado, como é o caso particular dos monobactâmicos, ligado a outro anel de cinco (tiazolidínico) ou de seis (hidrotiazínico) membros, formando as penicilinas e cefalosporinas, respectivamente. Os β-lactâmicos atuam inibindo as enzimas bacterianas responsáveis pela síntese da parede celular. Contudo, existem bactérias que são capazes de inativar os antimicrobianos β-lactâmicos por quatro mecanismos principais, sendo o mais comum a produção de β-lactamases, enzima capaz de destruir o antibiótico ou modificar grupos funcionais farmacologicamente importantes do antibiótico. A estrutura que confere atividade às penicilinas é o ácido 6-aminopenicilânico (6-APA). Diferentes penicilinas podem ser obtidas variando o ligante da cadeia lateral do 6-APA. As penicilinas G e V são as principais penicilinas de origem natural, obtidas por processo fermentativo descontínuo alimentado, empregando *Penicillium chrysogenum*, na presença de precursores específicos. As demais penicilinas são semissintéticas, em geral, derivadas do 6-APA, que por sua vez é obtido da hidrólise da penicilina G catalisada pela penicilina G acilase. O núcleo base que confere atividade às cefalosporinas é o ácido 7-aminocefalosporânico (7-ACA). Dentre as cefalosporinas naturais, a cefalosporina C, obtida de *Acremonium chysogenum* por processo fermentativo descontínuo alimentado, apresenta maior importância. Em geral, as cefalosporinas são bactericidas e apresentam resistência à β-lactamases. As cefalosporinas de uso clínico, em geral, são derivados semissintéticos do 7-ACA, o qual é obtido da hidrólise, química ou enzimática, da cefalosporina C. Diferentes cefalosporinas podem ser obtidas através de variação dos ligantes da cadeia lateral do 7-ACA. O ácido clavulânico, obtido por processo fermentativo de cepas de *Streptomyces clavuligerus*, atua como inibidor de β-lactamases, ligando-se à enzima e inativando-a. Este composto é prescrito clinicamente em combinação com outros antibióticos.

Questões

1. Explique os mecanismos de ação dos antimicrobianos. Dê exemplos de antibióticos para cada mecanismo abordado.
2. Como o ácido clavulânico mesmo com a baixa atividade antimicrobiana é utilizado no tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes à penicilina?
3. Relacione alguns aspectos importantes que dificultam a descoberta de novos agentes antimicrobianos. Justifique sua resposta.
4. O que são e como são obtidos os antibióticos naturais e semissintéticos?
5. Como você avalia a importância da penicilina no desenvolvimento da terapêutica antimicrobiana?
6. Um dos processos biotecnológicos de obtenção de β-lactâmicos é o processo fermentativo descontínuo alimentado, o que viria a ser esse processo e por que ele é interessante para a produção?

Tópicos para discussão

1. Classificação e mecanismo de ação dos diferentes antibióticos.
2. Processo de produção dos antibióticos diferenciando os biotecnológicos dos sintéticos.
3. Os problemas atuais advindos da resistência bacteriana a antibióticos.
4. Estratégias de contenção da disseminação de bactérias super-resistentes a antibióticos.

Sugestões para pesquisa

1. Desenvolvimento de novos antibióticos aplicados no combate às superbactérias.
2. Pesquisa de novas fontes para produção de moléculas antimicrobianas.

Referências

Abraham EP, Newton GGF. The structure of cephalosporin C. *Biochemical Journal*. 1961;79:377–393.

Allington DR, Rivey MR. Quinupristid/Dalfopristin: A Therapeutic Review. *Clinical Therapeutics*. 2001;23:24–44.

Arnstein HRV, Morris D. The structure of a peptide containing α-aminoadipic acid, cysteine, and valine, present in the mycelium of *Penicillium chrysogenum*. *Biochemical Journal*. 1960;76:357–361.

Backus MP, Stauffer JF. The production and selection of a family of strains in *Penicillium chrysogenum*. *Mycologia*. 1995;47:429–463.

Bennett JE. Fármacos antimicrobianos (continuação): Fármacos antifúngicos. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, eds. *Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica*. 9ª ed Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 1996:864–875.

Chambers HF, Sande MA. Fármacos antimicrobianos. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, eds. *Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica*. 9ª ed Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 1996:757–776.

Chambers HF, Sande MA. Fármacos antimicrobianos (continuação): Os aminoglicosídeos. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, eds. *Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica*. 9ª ed Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 1996:812–825.

Demain AL, Elander RP. The β-lactam antibiotics: past, present, and future. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1999;75:5–19.

Duplessis C, Crum-Cianflone NF. Ceftaroline: A New Cephalosporin with Activity against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Clinical Medicine Reviews in Therapeutics*. 2011:1–24.

Ebrahim GJJ. Bacterial resistance to antimicrobials. *Journal of Tropical Pediatrics*. 2010;56(3):141–143.

Elander RP. Industrial production of β-lactam antibiotics. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003;61:385–392.

Fawcett PA, Usher JJ, Huddleston JA, Bleaney RC, Nisbet JJ, Abraham EP. Synthesis of delta-(alphaaminoadipyl) cysteinylvaline and its role in penicillin biosynthesis. *Biochemical Journal*. 1976;157:651–660.

Fernandes P. Antibacterial discovery and development – the failure of success? *Nature Biotechnology*. 2006;24(12):1497–1503.

Fleming A. On the antibacterial action of cultures of a Penicillium, with special reference to their use in the isolation of *B influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology*. 1929;10:226–236.

Greer ND. Tigecycline (Tygacil): the first in the glycylcycline class of antibiotics. *Proceedings (Baylor University. Medical Center)*. 2006;19:155–161.

Guimarães DO, Momesso LS, Pupo MT. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. *Química Nova*. 2010;33(3):667–679.

Häbich D, Von Nussbaum F. Platensimycin, a new antibiotic and "superbug challenger" from nature. *ChemMedChem*. 2006;1(9):951–954.

Hirata DB, Oliveira JHHL, Leão K, Rodrigues VMI, Ferreira AG, Giulietti M, Barboza M, Hokka CO. Optimization of the precipitation of clavulanic acid from fermented broth using t-octylamine as intermediate. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2013;30(2):231–244.

Kapusnik-Uner JE, Sande MA, Chambers HF. Fármacos antimicrobianos (continuação): Tetraciclinas, cloranfenicol, eritromicina e outros fármacos antibacterianos. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, eds. *Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica*. 9ª ed Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 1996:826–848.

Kern WV. Daptomycin: first in a new class of antibiotics for complicated skin and soft-tissue infections. *International Journal of Clinical Practice*. 2006;60(3):370–378.

Knihinicki RD, Day RO, Williams KM. Chiral inversion of 2-arylpropionic acid non-steroidal anti-inflammatory drugs – II. Racemization and hydrolysis of (R)- and (S)- ibuprofen-CoA thioesters.

Biochemical Pharmacolology. 1991;42(10):1905–1911.

Lowe DA. 2001 Antibiotics. In: Ratledge C, Kristiansen B, eds. *Basic Biotechnology*. 2nd edCambridge University Press; 2012:349–375.

Mandell GL, Petri Jr W. Fármacos antimicrobianos (continuação): Penicilinas, cefalosporinas e outros fármacos β-lactâmicos. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, eds. *Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica*. 9ª ed Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 1996:790–811.

Mandell GL, Petri Jr W. Fármacos antimicrobianos (continuação): Fármacos utilizados na quimioterapia da tuberculose, da doença pelo complexo *Mycobacterium avium* e da lepra. In: Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG, eds. *Goodman e Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica*. 9ª ed Rio de Janeiro: McGraw-Hill; 1996:849–863.

Martinez R. Atualização no uso de agentes antifúngicos. *Jornal Brasileiro de Pneumologia*. 2006;32(5):449–460.

Masurekar P. Antibiotic production. In: Schaechter E, ed. *Encyclopedia of Microbiology*. 3th edAcademic Press; 2009:174–190.

Mota RP, Silva KPC, Freitas MFL, Porto WJN, Silva LBG. Artigo de Revisão: Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição à multirresistência bacteriana. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*. 2005;42(6):465–470.

Muller WH, Van Der Krift TP, Krouwer AJJ, Wosten HAB, Van Der Voort LHM, Smaal EB, Verkleij AJ. Localization of the pathway of the penicillin biosynthesis in *Penicillium chrysogenum*. *The EMBO Journal*. 1991;10(2):489–495.

Muñiz CC, Zelaya TEC, Esquivel GR, Fernández FJ. Penicillin and cephalosporin production: A historical perspective. *Revista Latinoamericana de Microbiología*. 2007;49(3-4):88–98.

Murray PR, Rosenthal KS, Peallerpfaller MA. *Medical Microbiology*. 5th ed USA: Elsevier Mosby; 2005.

Oliveira JHHL, Granato AC, Hirata DB, Hokka CO, Barboza M. Ácido clavulânico e cefamicina C: uma perspectiva da biossíntese, processos de isolamento e mecanismo de ação. *Química Nova*. 2009;32(8):2142–2150.

Patrick GL. *An Introduction to Medicinal Chemistry*. New York: Oxford University Press; 1995:154–204.

Payne DJ, Cramp R, Winstanley DJ, Knowles DJC. Comparative Activities of Clavulanic Acid, Sulbactam, and Tazobactam against Clinically Important 3-Lactamases. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 1994;38(4):767–772.

Raper KB. The development of improved penicillin producing molds. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1946;48:41–56.

Riley HD. *The story of penicillin (Alexander Fleming) The Journal of the Oklahoma State Medical Association*. 1972;(3):7–19.

Samson SM, Dotzlaf JE, Slisz ML, Becker GW, Van Frank RM, Veal LE, Yeh WK, Miller JR, Queener SW, Ingolia TD. Cloning and expression of the fungal expandase/hydroxylase gene involved in cephalosporin biosynthesis. *Nature Biotechnology*. 1987;5:1207–1214.

Saudagar P, Survase S, Singhal R. Clavulanic acid: A review. *Biotechnology advances*. 2008;26:335–351.

Schmitt EK, Hoff B, Kück U. Regulation of Cephalosporin Biosynthesis. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*. 2004;88:1–43.

Shlaes DM, The Miracle. In: Shlaes DM, ed. *Antibiotics The Perfect Storm*. Springer; 2010:9–14.

Silveira GP, Nome F, Gesser JC, Sá MM. Estratégias utilizadas no combate à resistência bacteriana. *Química Nova*. 2006;29(4):844–855.

Song JY, Jensen SE, Lee KJ. Clavulanic acid biosynthesis and genetic manipulation for its overproduction. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2010;88:659–669.

Spížek J, Řezanka T. Lincomycin, clindamycin and their applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2004;64:455–464.

Tavares W. Antibióticos e Quimioterápicos para o Clínico. *Atheneu*. 2007:586.

Ullán RV, Casqueiro J, Bañuelos O, Fernández FJ, Gutiérrez S, Martín JF. A novel epimerization system in fungal secondary metabolism involved in the conversion of isopenicillin N into penicillin N in *Acremonium chrysogenum*. *Journal of Biological Chemistry*. 2002;277(48):46216–46225.

Van Nistelrooij HJM, Krijgsman J, Devroom E, Oldenhof C. Penicillin update. In: Mateles RI, ed. *Penicillin: a paradigm for biotechnology*. Candida Corp, Chicago; 1998:85–91.

Vasconcelos AM, Soares FT, Vieira M, Souza LBS, Santana WJ, Coutinho HDM. Mecanismos de ação e resistência aos cetolídeos. *Revista de Ciências Médicas*. 2006;15(5):427–436.

Viana Marques DA, Carneiro Cunha MN, Araújo JM, Lima-Filho JL, Converti A, Pessoa-Jr A, Porto ALF. Optimization of clavulanic acid production by *Streptomyces* DAUFPE 3060 by response surface methodology. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011;42:658–667.

Volpato G, Rodrigues RC, Fernandez-Lafuente R. *Use of Enzymes in the Production of Semi-Synthetic Penicillins and Cephalosporins: Drawbacks and Perspectives Current Medicinal Chemistry*. 2010:3855–3873.

Waites MJ, Morgan NL, Rockey JS, Higton G. *Industrial microbiology: an introduction*. UK, Oxford: Blackwell; 2001:288.

Weber SS, Polli F, Boer R, Bovenberg RAL, Driessena AJM. Increased Penicillin Production in *Penicillium chrysogenum* Production Strains via Balanced Overexpression of Isopenicillin N Acyltransferase. *Applied and Environmental Microbiology*. 2012;78(19):7107–7113.

White JR. The Early History of Antibiotic Discovery: Empiricism Ruled. In: Dougherty TJ, Pucci MJ, eds. *Antibiotic Discovery and Development*. Springer; 2012:3–32.

Wilke MS, Lovering AL, Strynadka NC. Beta-lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Current Opinion in Microbiology*. 2005;8(5):525–533.

Williams JD. β-Lactamases and β-lactamase inhibitors. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 1999;12(1):S3–S7.

Wright GD. Q&A: Antibiotic resistance: where does it come from and what can we do about it? *BMC Biology*. 2010;8(123):1–6.

Zomorodian K, Uthman U, Tarazooie B, Rezaie S. The effect of griseofulvin on the gene regulation of β-tubulin in the dermatophyte pathogen *Trichophyton rubrum*. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2007;13:373–379.

CAPÍTULO

12

Produção Biotecnológica de Vitaminas

André Ohara

Gabriela Alves Macedo

Conceitos apresentados neste capítulo

Vitaminas são definidas como micronutrientes essenciais para o metabolismo de todos os organismos vivos, requeridas em pequenas quantidades e que não podem ser sintetizadas pelos mamíferos. Entretanto, a síntese de vitaminas ocorre naturalmente em plantas e micro-organismos, e sua produção industrial tem aumentado devido ao seu uso como aditivo alimentar e agente terapêutico. Atualmente, muitos alimentos processados, rações animais, produtos farmacêuticos, cosméticos, possuem a adição de vitaminas ou compostos relacionados.

Atualmente a maioria das vitaminas é produzida via síntese química, processos de extração ou pela combinação de ambos. Em relação à produção via microbiana, foco deste capítulo, seis vitaminas surgem como potenciais competidoras da síntese química, sendo algumas delas já produzidas biotecnologicamente em escala industrial.

Entre as vitaminas hidrossolúveis, inúmeros avanços foram obtidos na produção microbiana de Biotina, Riboflavina (B_2), Cobalamina (B_{12}) e Ácido ascórbico (vitamina C). Entre as quatro vitaminas lipossolúveis (A, D, E, K), as vitaminas E (α-tocopherol) e K_2 (menaquinona) apresentaram resultados promissores na produção biotecnológica em escala laboratorial.

Os processos biotecnológicos para produção destas seis vitaminas citadas serão abordados neste capítulo, com foco nos aspectos fisiológicos e metabólicos dos micro-organismos e sua relação com o processo laboratorial e industrial.

12.1. Introdução

As vitaminas são micronutrientes essenciais para o metabolismo de todos os organismos vivos. Elas são precursoras de coenzimas intracelulares necessárias em reações bioquímicas vitais para a célula. Humanos são incapazes de sintetizar a maioria das vitaminas, obtendo-as de forma exógena.

Apesar da maioria das vitaminas estarem presentes nos alimentos, o consumo médio diário nem sempre é alcançado apenas pela alimentação. Além disso, os níveis das vitaminas em fontes naturais como plantas e animais são relativamente baixos, apresentando variações extremas. Vitaminas são moléculas instáveis durante o processo de preservação do alimento, armazenamento ou preparo sendo muito sensíveis ao pH, calor, luz, oxigênio, etc.; as vitaminas hidrossolúveis, por exemplo, são facilmente perdidas durante a extração aquosa ou na manipulação dos alimentos.

Outro aspecto importante é que a deficiência em vitaminas é recorrente em muitos países, causada principalmente pela má-nutrição, não apenas como resultado de um consumo insuficiente de alimentos, mas também por dietas desbalanceadas. Estes fatores impulsionaram a produção industrial da grande maioria das vitaminas e também de fatores de crescimento.

A síntese química de vitaminas geralmente apresenta algumas desvantagens como alto consumo de energia, uso de reagentes tóxicos e geração de resíduos, resultando em um processo oneroso e de alto impacto ambiental. Entretanto a produção biotecnológica é realizada através da fermentação ou reações de bioconversão alcançando os enantiômeros desejados para uma específica vitamina. Os produtos da síntese orgânica são geralmente misturas racêmicas, cada uma desempenhando um papel biológico diferente. Além disso, o rendimento no processo biotecnológico pode ser otimizado utilizando técnicas como a engenharia genética de linhagens microbianas, análise de metabólitos tóxicos, purificação da vitamina alvo, etc.

Desta forma, inúmeros trabalhos recentes têm como principal objetivo explorar o potencial biotecnológico da produção de vitaminas, pigmentos e fatores de crescimento. Algumas dessas pesquisas, bem como patentes e empresas que produzem vitaminas através do processo fermentativo serão abordados neste capítulo.

12.2. Vitaminas hidrossolúveis

Vitaminas hidrossolúveis apresentam-se dissolvidas em água e não são armazenadas no corpo. Desta forma, tais vitaminas são necessárias na dieta diária, sendo o excesso eliminado na urina. As vitaminas hidrossolúveis incluem as vitaminas do complexo B e a vitamina C.

As vitaminas hidrossolúveis abrangem um grupo heterogêneo de substratos metabólicos e cofatores que são essenciais para as funções celulares, crescimento e desenvolvimento. A função bioquímica/fisiológica da maioria das vitaminas hidrossolúveis é fazer parte de coenzimas responsáveis por reações bioquímicas específicas (serão tratadas nos subitens deste capítulo). A deficiência destes micronutrientes é responsável por inúmeros distúrbios desde anemia até desordens neurológicas, entretanto níveis ideais destas vitaminas trazem efeitos positivos para saúde. Embora a dieta seja considerada a principal fonte de vitaminas hidrossolúveis em humanos, nos últimos anos, o interesse na contribuição da microflora intestinal na homeostase desses micronutrientes tem estimulado inúmeras pesquisas na compreensão deste fenômeno.

Entre as vitaminas hidrossolúveis, alguns avanços foram obtidos na produção biotecnológica de Biotina, Riboflavina (B_2), Cobalamina (B_{12}) e Ácido ascórbico (vitamina C), que serão abordados nos subitens a seguir:

12.2.1. Biotina

A biotina ou vitamina H apresenta-se em pó ou micro agulhas incolores, sendo solúvel em álcool e em água alcalina, apresentando estabilidade à luz e a temperaturas até 100°C quando em solução aquosa ou material seco. Insolúvel em solventes orgânicos comuns, esta vitamina é um cofator essencial para reações catalisadas por carboxilases, sendo comercializada como alimento ou aditivo alimentar, aditivo cosmético ou produto farmacêutico.

Comparada com outros tipos de vitaminas, a biotina é um produto caracterizado por apresentar-se em pequenos volumes, contudo atualmente são produzidas cerca de 100 toneladas por ano dessa vitamina, sendo a empresa farmacêutica Hoffmann-La Roche a maior produtora. Grande parte da biotina vendida é sintetizada quimicamente (síntese de Goldberg e Sternbach), contudo muitos esforços estão sendo direcionados no desenvolvimento de micro-organismos capazes de superexpressar genes

responsáveis pela produção de biotina, já que a síntese química está ligada a inúmeros impactos ambientais.

As pesquisas desenvolvidas nas últimas décadas, envolvendo a produção biotecnológica de biotina, trabalham em sua grande maioria utilizando as técnicas de DNA recombinante. Em trabalhos desenvolvidos utilizando linhagens recombinantes das bactérias *Serratia marcescens* e *Escherichia coli* foram obtidas produções de biotina de 600 mg L^{-1} e 970 mg mL^{-1} respectivamente. Os melhores resultados de produção desta vitamina foram reportados na patente desenvolvida por Bower *et al.* (2001), os quais utilizaram linhagens recombinantes de *Bacillus subtilis* resistentes a ácido 5-(3-tienil) pentanoico e com o gene *bio* (gene responsável pela síntese de biotina) superexpresso. Este trabalho alcançou uma produção de biotina superior a 1g L^{-1} de meio de cultura.

Apesar dos rendimentos alcançados nos estudos apresentados estarem bem próximos de uma produção rentável, nenhuma das linhagens mencionadas conseguem produzir biotina o bastante para tornar a produção biotecnológica viável. Deve-se levar em consideração que, em muitos destes estudos, ocorreu adição de precursores da biotina durante o cultivo, e a fermentação foi realizada em um meio complexo tornando o processo oneroso. Outros fatores que dificultam a produção microbiológica de biotina são a instabilidade dos plasmídeos nas linhagens recombinantes, a possibilidade de efeitos tóxicos de alguns metabólitos e também o custo dos processos de purificação.

Em relação à rota metabólica responsável pela produção de biotina, um fator limitante pode influenciar a sua produção em linhagens bacterianas. A biossíntese ocorre a partir do ácido pimélico via ácido 7 ceto-8-amino pelargônico (KAPA), ácido 7,8-diamino pelargônico (DAPA) e DTB. Neste caminho biossintético, 4 enzimas estão envolvidas na síntese de biotina. Estas enzimas são codificadas pelos genes *bioA*, *bioB*, *bioD*, e *bioF*. O gene *bioF* codifica a enzima KAPA sintetase, a qual catalisa a conversão de pimelil CoA em KAPA. O gene *bioA* codifica a DAPA aminotransferase, que converte KAPA em DAPA. O gene *bioD* codifica a DTB sintetase, que converte DAPA em DTB. O gene *bioB* codifica a biotina sintetase, que converte DTB em biotina (Figura 12.1). O principal problema na síntese de biotina é a ação repressiva da própria biotina em todas as enzimas citadas.

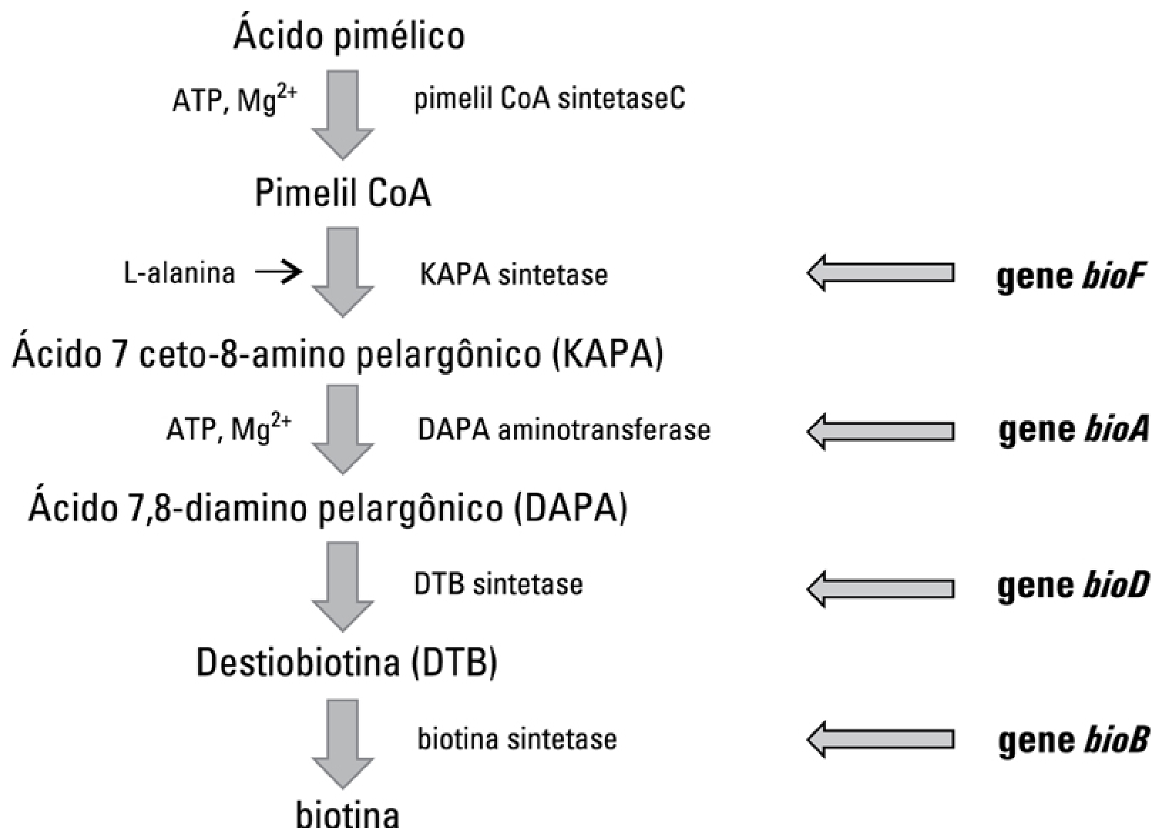


FIGURA 12.1 Rota metabólica responsável pela produção de biotina em linhagens de bactérias. *Fonte*: Adaptado de Survase *et al.* (2006).

Desta forma a bioprospecção de novas linhagens microbianas produtoras de biotina, estudos sobre a otimização da produção e purificação desta vitamina, análises de metabólitos tóxicos ou repressores e utilização de técnicas do DNA recombinante são importantes aspectos para desenvolver um processo biotecnológico rentável que possa substituir com eficiência a síntese química.

12.2.2. Riboflavina (B_2)

A riboflavina ou B_2 é um sólido microcristalino de cor amarelo alaranjada, amargo e inodoro. Decompõe-se rapidamente em meio alcalino e também na presença de luz, embora seja resistente ao calor e aos ácidos. Esta vitamina é um precursor das coenzimas flavina adenina dinucleotídeo (FAD) e flavina mononucleotídeo (FMN), que são requeridas em reações tais como as de oxidação enzimática de carboidratos.

Riboflavina é produzida em inúmeras quantidades. Em 2012, a produção total dessa vitamina no mundo foi de cerca de 9000 toneladas, a maioria produzida pelas empresas BASF, DSM e Hubei Guangji Pharmaceutical.

Cerca de 70% dessa produção é usada como aditivo na ração animal, e 30% como fortificante de alimentos e fins medicinais. Nas últimas décadas, a produção microbiana de riboflavina aumentou significativamente e, se esta tendência continuar, a síntese química será substituída completamente.

Atualmente a produção dessa vitamina é realizada utilizando linhagens recombinantes da bactéria Gram-positiva *Bacillus subtilis*, da levedura *Candida famata* dep8 e também com o fungo filamentoso *Ashbya gossypii*. O fluxo metabólico de cada micro-organismo está representado na Figura 12.2. A levedura *C. famata* possui uma rota metabólica simples até a guanosina trifosfato (GTB), que representa a entrada para a biossíntese de riboflavina. Esta *Candida* utiliza glicose como fonte de carbono convertendo-a em ribulose-5-fosfato, que é um precursor do 4-dihidróxido-2-butanona-4-fosfato (DBP). Vale ressaltar que as bifurcações nas rotas metabólicas a seguir não representam caminhos alternativos, mas sim complementares. Por exemplo, a molécula de DBP será necessária para a conversão de 5-amino-6-ribitilamino-2 (ARP) em dimetil-8-ribitilumazina (DMRL). As células de *Bacillus* seguem uma rota diferente da levedura e convertem a glicose em guanosina monofosfato (GMP) que é precursora do (GTB).

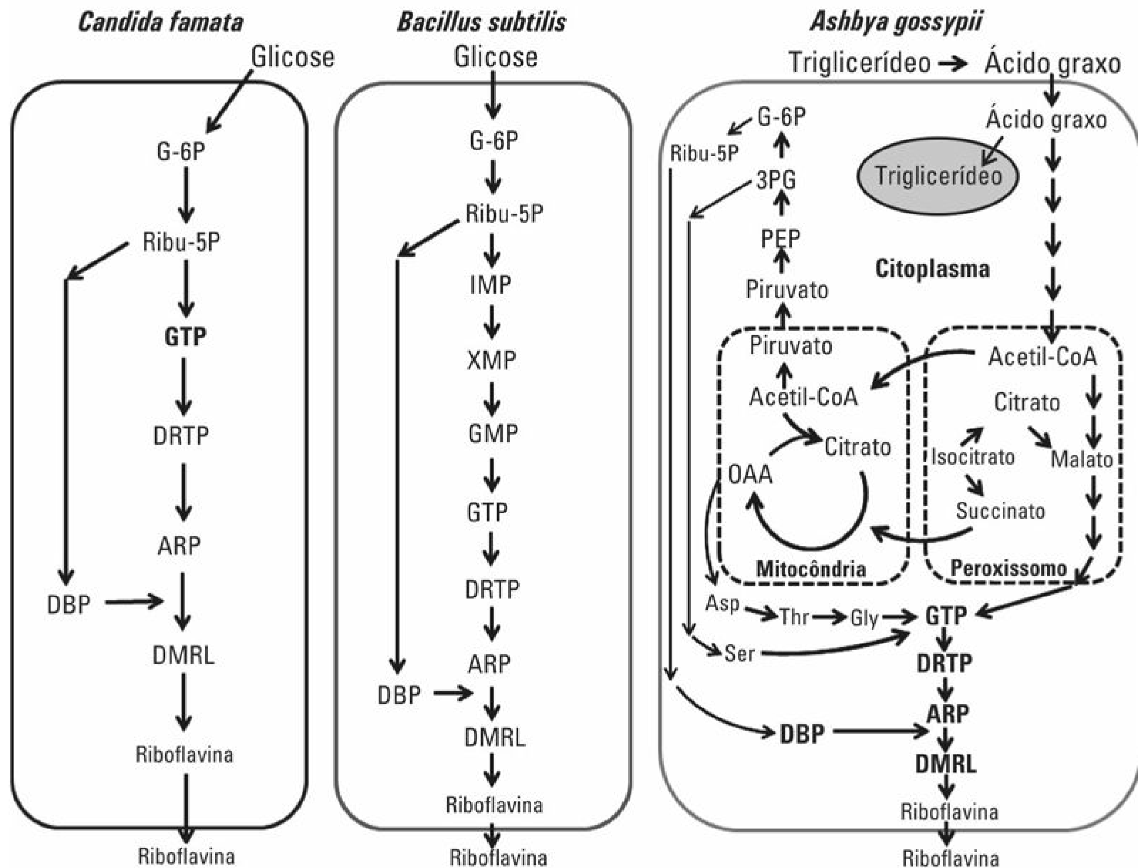


FIGURA 12.2 **Modelo proposto para a síntese de riboflavina em *A. gossypii*, *B. subtilis*, and *C. famata*. Abreviações: G-6P (Glicose-6-fosfato); 3PG (3-fosfoglicerato); PEP (fosfoenolpiruvato); Ribu-5P (Ribulose-5-fosfato); OAA (Oxaloacetato); Asp (Aspartato); Thr (Treonina); Gly (Glicina); Ser (Serina); GTP (Guanosina trifosfato); GMP (Guanosina monofosfato); XMP (Xantina monofosfato); IMP (Inosina monofosfato); DRTP (2, 5-diamino-6-ribosilamino-4 (3H) pirimidinadiona 5-fosfato); ARP (5-amino-6-ribitilamino-2, 4 (1H, 3H) pirimidina); DBP (L-3, 4-dihidroxido-2-butanona-4-fosfato); DMRL (6, 7 dimetil-8-ribitilumazina).** *Fonte*: Adaptado de Lim *et al.* (2001).

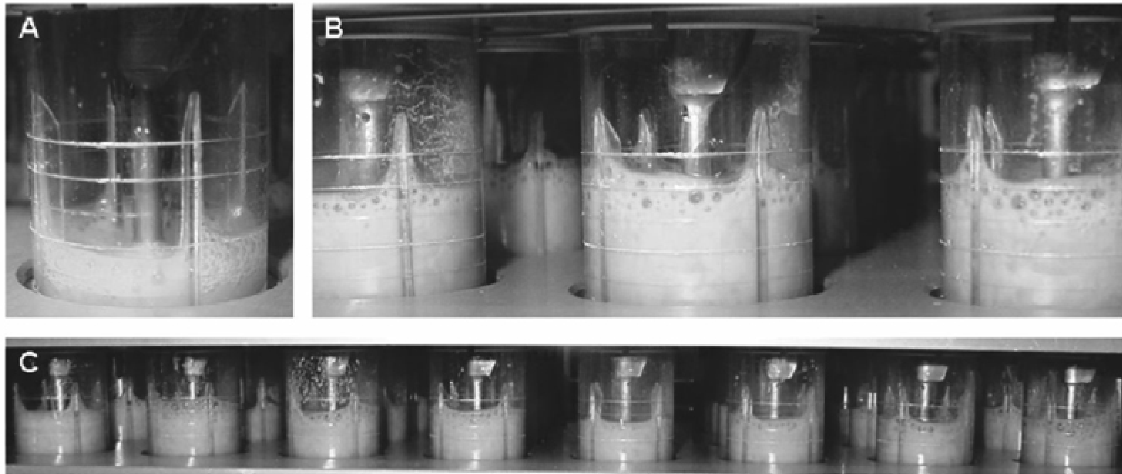


FIGURA 12.3 **Produção de riboflavina por *B. subtilis* em biorreatores paralelos após 9,5 horas (A) e 24 horas (B e C).**
Fonte: Trabalho realizado por Knorr *et al.* (2007).

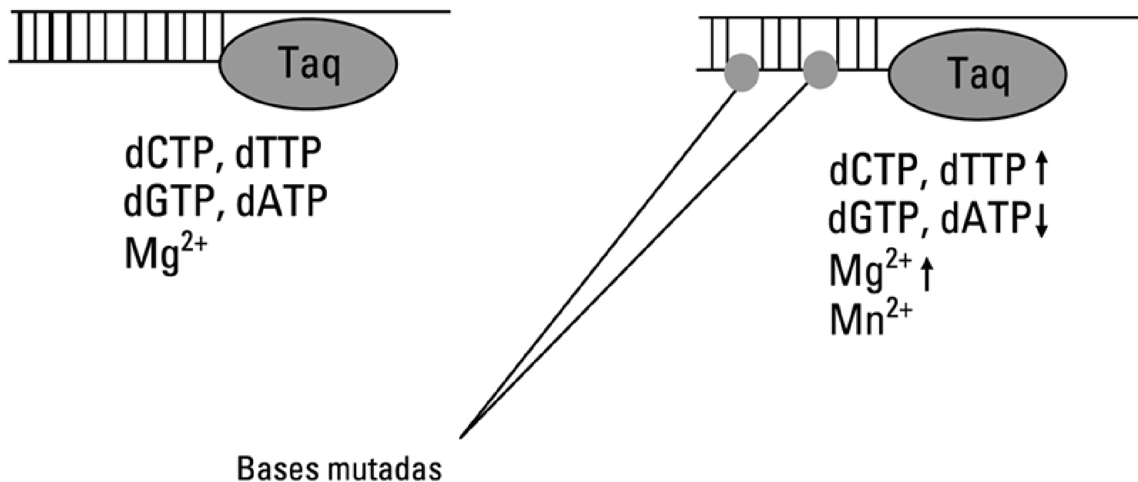


FIGURA 12.4 **Controlando a composição da solução tampão os nucleotídoes serão pareados de forma errada gerando assim uma diversidade de mutantes. Abraviações: dATPn (desoxiAdenosina Trifosfatada); dCTP (desoxiCitidina Trifosfatada); dGTP (desoxiGuanosina Trifosfatada); dTTP (desoxiTimidina Trifosfatada); Mg^{2+} (íon magnésio); e Mn^{2+} (íon manganês).** *Fonte*: adaptado de iGEM 2007.

Os produtores mais populares de riboflavina são os fungos *A. gossypii* e *Eremothecium ashbyii*. Destas duas linhagens, *A. gossypii* especificamente utiliza óleo vegetal obtido pela hidrólise de ácidos graxos utilizando lipase extracelular, assim os ácidos graxos resultantes são utilizados nos peroxissomos para síntese da vitamina. A biossíntese começa pela acetilcoenzima A (Acetil-CoA) formando através de inúmeras reações enzimáticas o malato, que é o precursor do GTB. O malato também é sintetizado por meio do citrato proveniente do ciclo de Krebs. Este citrato é convertido em isocitrato nos peroxissomos, posteriormente o isocitrato é parcialmente convertido em glicosilato que finalmente será convertido em malato.

As melhores linhagens e processos fermentativos foram atingidos com *A. gossypii* e *Bacillus*. A fermentação utilizando o fungo *A. gossypii* ocorre em 8-10 dias, incluindo crescimento celular por dois dias seguido pela síntese de riboflavina. Óleo vegetal e glicina são necessários para estimular biossíntese da vitamina durante a fermentação realizada por *A. gossypii*, enquanto que a adição de carboidrato é necessária na síntese realizada por *Bacillus*. O rendimento riboflavina/carbono é de 4-5% (g de riboflavina/ g de glicose) na adição de carboidrato. Quando ocorre adição de óleo o rendimento é cerca de 18% (g de riboflavina/ g de óleo).

A empresa DSM utiliza uma linhagem de *B. subtilis* geneticamente modificada. A BASF utiliza o fungo *A. gossypii* que consome grandes quantidades de óleo durante a síntese de riboflavina. Tal produção ocorre na fábrica em Gunsan, Coreia do Sul. A riboflavina utilizada para ração animal é vendida por cerca de $15/Kg, enquanto a utilizada para alimentação humana é comercializada por $35-50/Kg, este último apresenta grande variação, pois é altamente dependente da demanda do mercado.

Para melhorar a produção de riboflavina, o meio de cultura e as condições fermentativas têm sido otimizados, e muitos mutantes foram isolados por UV, agentes químicos ou engenharia genética pela manipulação de genes envolvidos na síntese dessa vitamina. Em geral, o metabolismo é controlado por vários fatores globais e a superexpressão ou deleção de inúmeros genes apresenta-se como uma técnica limitada. Para redirecionar o metabolismo de micro-organismos focando na superprodução de riboflavina, uma mudança global na expressão gênica provavelmente será mais benéfica. Assim a técnica do PCR mutagênico (error-prone PCR – ver o quadro a seguir) é uma interessante estratégia para alcançar essa mudança e introduzir um grande número de mutações não letais no genoma. Essas mutações são acumulativas e podem gerar mutantes para superprodução de riboflavina que não podem ser isolados pela mutagênese convencional. Sendo assim, a combinação de análises

genômicas e do metabolismo (metabolômica), utilizando a técnica do PCR mutagênico, pode revelar novos alvos no fluxo da síntese de riboflavina possibilitando futuras melhorias na produção dessa vitamina.

Exemplo de fixação

PCR mutagênico (error-prone PCR) na superprodução de riboflavina

PCR mutagênico (error-prone PCR) é um método no qual mutações randômicas são inseridas em regiões do DNA. Esta técnica tem como base a reação de PCR (Polimerase Chain Reaction) que é uma técnica frequentemente utilizada em laboratórios de biologia molecular. Normalmente a replicação do DNA é extremamente específica, a diferença é que no error-prone a fidelidade da enzima Taq polimerase é modulada, pois a solução tampão (onde ocorre a reação) é modificada. Nessas condições a polimerase comete erros no pareamento de bases durante a síntese de DNA, esses erros estarão presentes na nova fita de DNA sintetizada. Assim, controlando a composição da solução tampão cuidadosamente, a frequência de erros na incorporação das bases e o número de erros podem ser regulados. Em experimentos de evolução dirigida, a frequência de substituição é normalmente regulada para que ocorra de 1 a 3 substituições de pares de bases em uma região cujo tamanho seja correspondente a 1000 pares de bases. Nesse tipo de reação é importante que a Taq polimerase não possua a habilidade de autocorreção (proof-reading). Essas enzimas automaticamente corrigem nucleotídoes pareados de forma errada, e assim as mutações inseridas serão perdidas.

Em trabalho recente desenvolvido por Park *et al.* (2011) um mutante de *A. gossypii* produtor de riboflavina foi gerado pela técnica de PCR mutagênico. Após um processo composto de varias etapas de seleção que envolveu mais de 1.353 colonias, uma linhagem de *A. gossypii* foi capaz de produzir 13,7 g L^{-1} de riboflavina em um biorreator de 3 litros, utilizando meio de cultura otimizado. Tal produção foi nove vezes maior que a realizada pela linhagem selvagem de *A. gossypii*, evidenciando a eficiência desta técnica.

12.2.3. Cobalamina (B_{12})

Considerando todas as coenzimas, cofatores, grupos prostéticos encontrados na natureza a cobalmina (B_{12}) pode ser considerada uma das mais fascinantes do mundo. Essa vitamina chegou ao mundo da ciência pelos físicos norte-americanos Minot, Murphy and Whipple que ganharam o prêmio Nobel em 1934 por demonstrarem que a anemia perniciosa poderia ser curada com uma dieta que incluísse fígado de boi (alimento altamente rico em cobalamina). A identidade dessa vitamina permaneceu desconhecida até meados de 1948, quando dois grupos farmacêuticos (Merck e Glaxo), simultaneamente isolaram um composto vermelho cristalino capaz de curar a anemia perniciosa. Esse composto foi nomeado vitamina B_{12}.

Após inúmeras pesquisas, o papel bioquímico da cobalamina foi elucidado. Nos humanos é necessário um consumo de aproximadamente 2 μg por dia dessa vitamina. As estruturas naturais de cobalamina (adenosilcobalamina e metilcobalamina) auxiliam na ação de duas enzimas; metionina sintetase e metilmalonil-CoA mutase. A vitamina B_{12} é comercialmente produzida como cianocobalamina, pois os grupos adenosil e metil são substituídos pelo grupo ciano durante o processo de extração devido à estabilidade do grupo ciano.

A deficiência dessa vitamina pode ocasionar transtornos hematológicos, neurológicos e cardiovasculares, estando também relacionada com a hiper-homocisteina um fator independente de risco cardiovascular e de danos neuronais.

A biossíntese de cobalamina é restrita aos micro-organismos, produzida apenas por procariotos. Devido a sua complexa estrutura química, mais de 30 genes são necessários para a síntese da vitamina B_{12}. Na natureza existem duas rotas biossintéticas para a produção de cobalamina; (1) aeróbica - rota dependente de oxigênio, que é encontrada em organismos como a bactéria aeróbica Gram-negativa *Paracoccus denitrificans*. (2) anaeróbica - rota independente de oxigênio, encontrada em organismos como *Bacillus megaterium*, *Propionibacter shermani* e *Salmonella typhimurium*. A Figura 12.5 apresenta a biossíntese de cobalamina e as diferenças entre a rota aeróbica e anaeróbica.

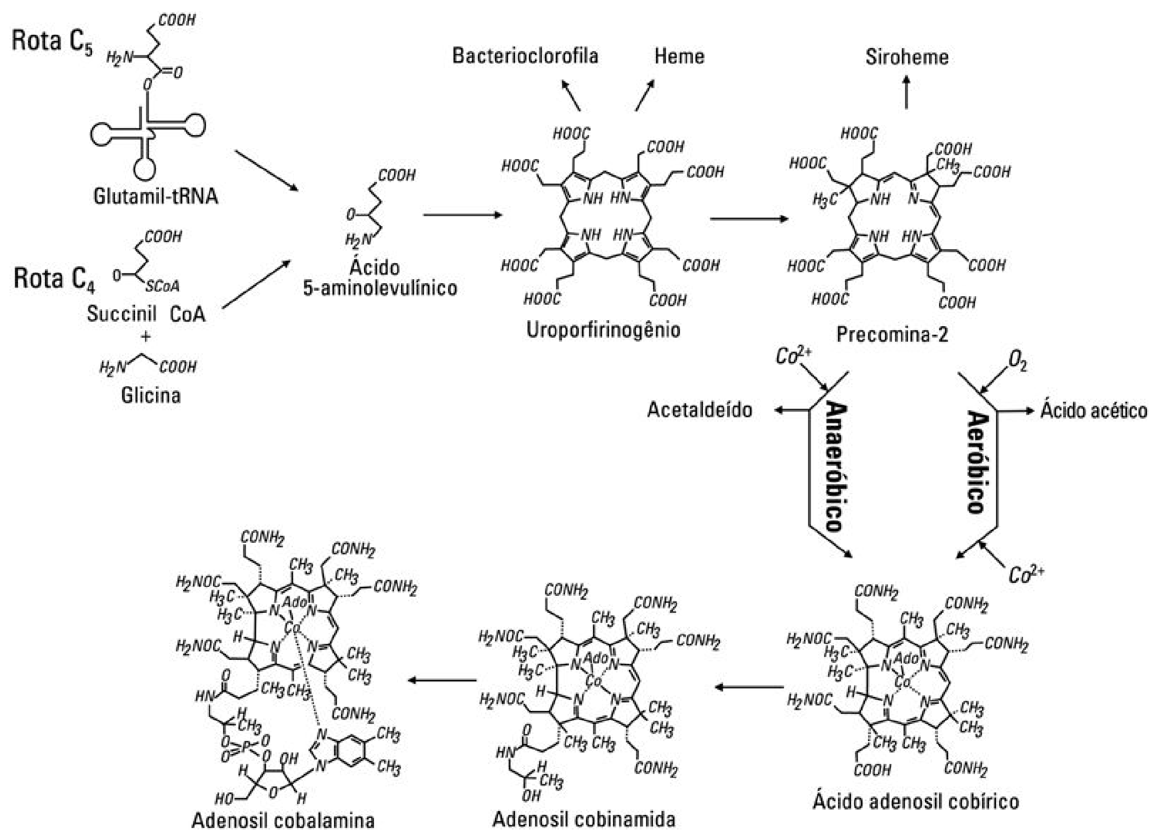


FIGURA 12.5 Representação esquemática das rotas aeróbica e anaeróbica na biossíntese de cobalamina. *Fonte*: Adaptado de Martens *et al.* (2002).

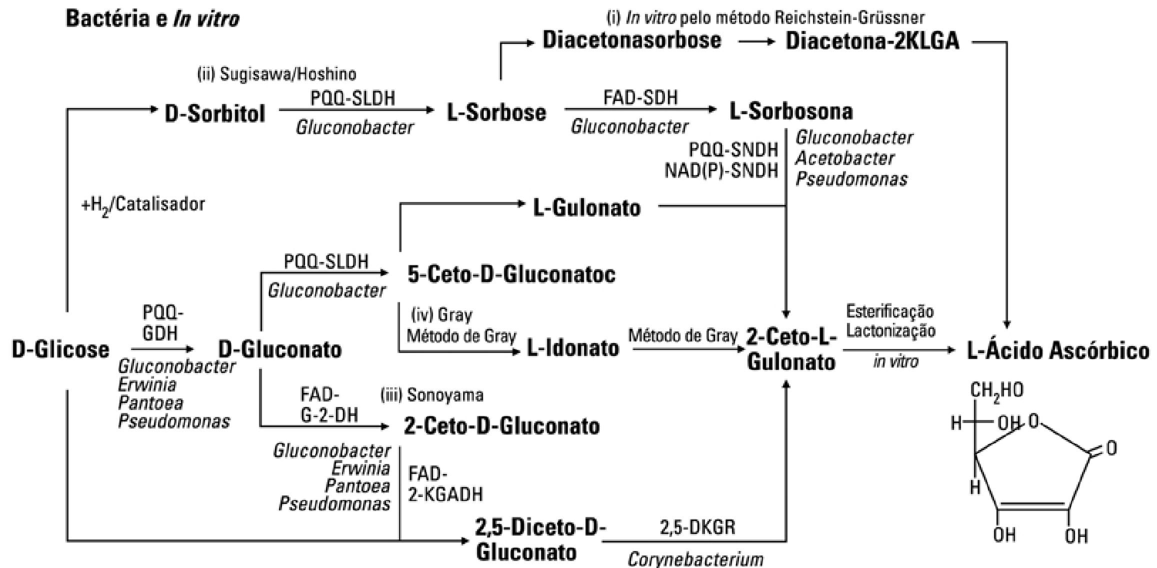


FIGURA 12.6 Comparação das estratégias adotadas para a produção de ácido L- -ascórbico. (i) Método químico desenvolvido por Reichstein e Grüssner, no qual a biotransformação de D-sorbitol para L-sorbose foi inserida; (ii) estratégia envolvendo L-sorbose desidrogenase (FAD-SDH), L-sorbose desidrogenase citosólica (NAD(P)- -SNDH) e L-sorbose desidrogenase ligada à membrana (PQQ-SNDH); (iii) Síntese de Ácido 2-ceto-L-glucônico 2-KLGA via 2-ceto-D-gluconato e 2,5-diceto-D-gluconato a partir de D-glicose; e (iv) Conversão de D-gluconato para 2-KLGA via 5-ceto-D- -gluconato. Abreviações: DH (desidrogenase); SLDH (D-sorbitol DH); SDH (L-sorbose DH); SNDH (L-sorbosona DH); GDH (D-glicose DH); G-2-DH (D-gluconato-2 DH); 2-KGA-DH (2-ceto-D-gluconato DH); 2,5-DKGR (2,5-diceto-D-gluconato redutase). *Fonte*: Adaptado de Bremus *et al.* (2006).

Na produção industrial de cobalamina, a *Pseudomonas denitrificans* tem sido utilizada com grande sucesso pela empresa farmacêutica francesa Rhône-Poulenc, a qual se fundiu com a alemã Hoechst AG em 1999, formando a Aventis. A partir de 2015, as operações farmacêuticas da Rhône-Poulenc passaram a fazer parte da Sanofi e as divisões de produtos químicos fazem parte do grupo Solvay e Bayer Crop Science.

O grupo de pesquisadores da Rhône-Poulenc é hoje responsável pela maior produção mundial de vitamina B_{12}, utilizando a via biotecnológica. Tal sucesso ocorre devido à escolha pela via aeróbica, já que nessa rota a adição de cobalto ocorre de forma tardia na biossíntese. Desta forma não há formação de complexos de cobalto que são instáveis. Além disso, os cientistas franceses foram os primeiros a estudar a bactéria *P. denitrificans* no âmbito da genética, biologia molecular, que combinadas com a

enzimologia, síntese química, utilização de isótopos radioativos e ressonância magnética nuclear (RMN) garantiram o sucesso da empresa.

Atualmente a literatura relata inúmeros estudos que almejam aumentar o rendimento da vitamina B_{12}. As estratégias adotadas são diversas, tais como: otimização de meio de cultura e de condições de cultivo, engenharia metabólica, superexpressão e deleção de genes. Por exemplo, em trabalhos realizados por Wang *et al.* (2010) e Li *et al.* (2008), o processo de cultivo foi otimizado controlando-se o teor de oxigênio dissolvido e o pH. Ambos conseguiram produções de cobalamina de 208 mg L^{-1} e 214,3 mg L^{-1} respectivamente.

Apesar de altos rendimentos alcançados nos estudos relatados pela literatura nas últimas décadas, o mesmo raciocínio feito para a produção de riboflavina pode ser aplicado para os estudos relacionados com a produção de cobalamina. Para alcançar uma superprodução da vitamina B_{12} são necessárias abordagens globais do metabolismo do micro-organismo produtor. Assim, estratégias como a biologia de sistemas e biologia sintética são interessantes opções para construção de células robustas para a produção de cobalamina.

12.2.4. Ácido ascórbico (vitamina C)

O ácido ascórbico também conhecido como vitamina C, é uma vitamina hidrossolúvel indispensável para as funções fisiológicas. Foi primeiramente isolada de glândulas adrenais e posteriormente caracterizada de tecidos vegetais. A vitamina C é um nutriente essencial, pois humanos e alguns mamíferos não são capazes de sintetizá-la. Nestes organismos o gene que codifica a enzima l-gulono-1,4- -lactona oxidase não é funcional. Essa enzima é responsável pela última etapa da biossíntese do ácido ascórbico. Por causa de seu papel antioxidante e em funções metabólicas, a vitamina C precisa ser incorporada como parte da dieta humana.

O ácido ascórbico participa de inúmeras funções celulares como na síntese de colágeno, e também funcionando como um “sequestrador” de espécies reativas de oxigênio, que estão relacionadas com distúrbios crônicos como doenças cardiovasculares e o câncer. Além disso, pesquisas recentes destacam o papel do ácido ascórbico na atividade de inúmeras enzimas envolvidas na sinalização celular e na ativação de fatores de transcrição, gerando assim novas perspectivas para as pesquisas futuras.

Dentre todas as vitaminas, o ácido ascórbico é o que possui a maior produção industrial. Cerca de 110 mil toneladas são produzidas anualmente, desta produção 50% são destinados para a indústria farmacêutica, 25% para uso como antioxidante em alimentos, 15% para o

setor de bebidas e cerca de 10% para a aplicação na ração animal. Com isso podemos notar um contraste, pois o grande mercado consumidor das vitaminas é o de ração animal, o que não acontece com a vitamina C. Atualmente mais de 80% da demanda mundial pelo ácido ascórbico é atendida por produtores chineses. Após agressivas batalhas de preços durante os últimos 20 anos, a DSM (antiga Roche vitaminas), permanece como a única produtora de vitamina C no ocidente. Com a marca Quali ®-C para os seus produtos de vitamina C, a empresa posicionou-se no segmento Premium do mercado, que é menos afetado pela alta volatilidade de preço presente no mercado de produção em massa.

Nas últimas décadas, inúmeras estratégias biotecnológicas têm sido desenvolvidas para simplificar a síntese de ácido ascórbico. A maioria dos processos conhecidos tem como objetivo a síntese de Ácido 2-ceto-L-gulônico como um principal intermediário que pode ser convertido em ácido ascórbico por uma catálise química convencional. A produção microbiana de Ácido 2-ceto-L-gulônico utiliza geralmente linhagens de bactérias dos gêneros *Gluconobacter, Acetobacter, Ketogulonicigenium, Pseudomonas, Erwinia* e *Corynebacterium*. Essa produção algumas vezes é realizada com uma mistura destas culturas e também utilizando linhagens melhoradas por engenharia genética.

Atualmente para a produção do ácido ascórbico, o processo industrial utiliza predominantemente a chamada fermentação em duas etapas. Na primeira etapa, o D-sorbitol é oxidado a L-sorbose utilizando o micro-organismo *Gluconobacter oxydans*. Na segunda etapa é realizada uma fermentação com uma cultura mista de *Ketogulonicigenium vulgare* e *Bacillus megaterium*, convertendo L-sorbose em ácido 2-ceto-L-gulônico, o qual é convertido quimicamente em ácido ascórbico.

Devido ao uso difundido das leveduras na bioindústria, o desenvolvimento de linhagens capazes de realizar a fermentação direta de açúcares simples em ácido ascórbico tem atraído inúmeras pesquisas nas últimas décadas. Durante muitos anos questionou-se sobre a capacidade das leveduras de realmente sintetizar a vitamina C, já que alguns estudos constataram a presença de ácido ascórbico em extratos de leveduras. Entretanto, hoje sabe-se que as leveduras não produzem tal ácido, mas sim um análogo chamado ácido eritro-ascórbico (D-EAA). Apesar de esta substância ser diferente do ácido ascórbico, ela conserva caraterísticas similares, agindo como antioxidante em leveduras. Desta forma o D-EAA pode substituir o ácido ascórbico em algumas aplicações industriais, contudo tal substância não possui atividade contra o escorbuto, o que reduz significantemente o seu valor de mercado.

Em relação à produção de ácido ascórbico por leveduras, um fato interessante pode ser destacado, a rota biossintética para a produção de D-EAA assemelha-se muito à rota para produção de ácido ascórbico em plantas. De acordo com a Figura 12.7, nas leveduras, D-arabinose é convertida em D-arabinono-1,4-lactona, que posteriormente é convertido em D-EAA. As estruturas das moléculas alteradas durante a síntese são idênticas às mudanças que ocorrem na conversão de L-galactose para ácido ascórbico via L-galactono-1,4-lactona em plantas. Outro fato interessante é que a enzima D-arabinono-1,4-lactona oxidase (D-AL-Ox na Figura 12.7) produzida pelas leveduras *Candida albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, foi purificada e caracterizada, e surpreendentemente tal enzima foi capaz de converter (*in vitro*) três substratos diferentes em ácido ascórbico: L-arabinono-1,4- lactona, L-galactono-1,4-lactona e L-gulono-1,4-lactona. Além disso, estudos envolvendo *C. albicans* mostraram que o cultivo de células na presença de L-galactono-1,4- -lactona ocasionou um acúmulo considerável de ácido ascórbico intracelular.

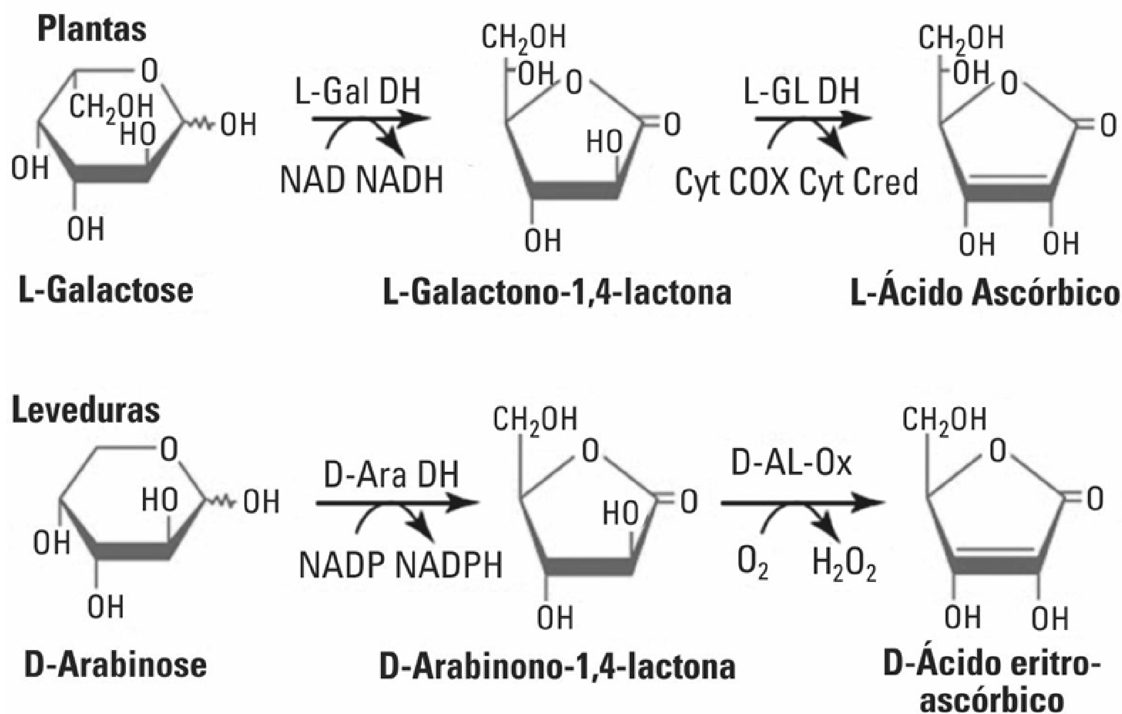


FIGURA 12.7 Comparação da rota biossintética do ácido ascórbico nas plantas e do ácido eritro-ascórbico nas leveduras. Abreviações: DH (desidrogenase); l-GaL-DH (l- -galactose DH); l-GL-DH (l-galactono-1,4-lactona DH); d-Ara-DH (d-arabinose DH); d-AL-Ox (d-arabinono-1,4-lactona oxidase). *Fonte*: Adaptado de Hancock e Viola (2002).

Outro estudo interessante envolvendo a produção de vitamina C por leveduras foi realizado por Sauer *et al.* (2004), que expressaram a enzima L-galactose desidrogenase originalmente da planta *Arabidopsis thaliana*, em *S. cerevisiae*. Desta forma além de alcançar uma superprodução da enzima D-AL-Ox, tal linhagem recombinante produziu cerca de 100 mg L^{-1} de ácido ascórbico utilizando L-galactose como substrato. Contudo o alto custo deste substrato torna o processo economicamente inviável. Portanto, outras estratégias podem ser adotadas como, por exemplo, a seleção de linhagens de bactérias capazes de converter substratos de baixo custo em L-galactose para cultivo misto com células de leveduras. Outra opção seria a utilização de procariotos recombinantes carregando os genes da rota do D-EAA.

Leveduras geneticamente modificadas com os genes da rota biossintética do ácido ascórbico oferecem também uma interessante oportunidade de aplicação em processos fermentativos nos quais o ácido ascórbico é necessário, tais como na produção de pão, vinho e cerveja.

Em relação à produção de vitamina C por fungos filamentosos, a literatura apresenta poucos trabalhos nessa área. Entretanto essa tendência

pode estar mudando, pois algumas pesquisas recentes envolvendo engenharia genética de *Aspergillus niger* e bioprospecção de fungos filamentosos para produção de ácidos orgânicos foram apresentadas nos últimos anos. Podemos citar como exemplo o trabalho realizado por Kuivanen *et al.* (2015) que introduziram genes de *Euglena gracilis* e da planta *Malpighia glabra* no fungo filamentoso *Aspergillus niger* para a conversão do ácido galacturônico em ácido ascórbico.

Nas últimas décadas alguns estudos envolvendo a produção de ácido ascórbico por microalgas foram realizados. Entretanto os resultados apresentam-se insatisfatórios, pois foram obtidos baixos rendimentos. Os resultados mais promissores foram obtidos com as microalgas *Chlorella pyrenoidosa* e do gênero *Prototheca* (Figura 12.8). A microalga *C.pyrenoidosa,* inclusive, foi capaz de produzir cerca de 2 g L^{-1} de ácido ascórbico em meio de cultivo a partir de 80 g L^{-1} de D-glicose. Tal processo foi patenteado como um método para produção de biomassa aprimorada com ácido ascórbico para ração animal e suplementos. Entretanto estudos ainda são necessários para viabilizar a produção comercial de vitamina C por microalgas. Devido à baixa taxa de crescimento e metabolismo quando comparadas a bactérias e culturas de leveduras, as microalgas ainda não oferecem uma oportunidade competitiva para bioprodução desta vitamina.

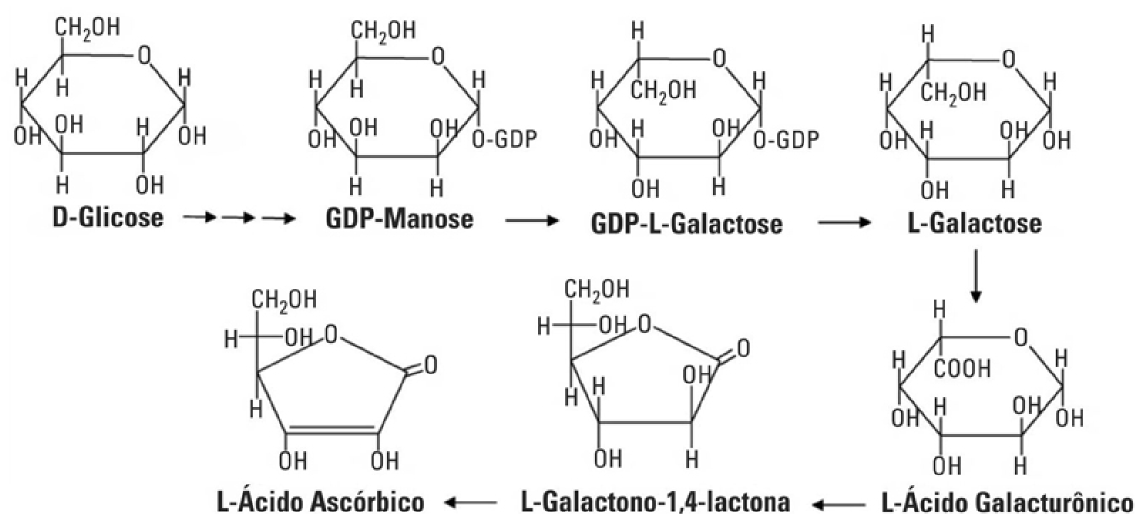


FIGURA 12.8 Rota metabólica proposta para a síntese do ácido ascórbico em *Prototheca moriformis*. Apenas as últimas cinco reações estão ilustradas. *Fonte*: Adaptado de Bremus *et al.* (2006).

Atualmente, uma parte considerável da vitamina C produzida industrialmente ainda é sintetizada pelo método químico de Reichstein e

Grüssner. Entretanto a crescente demanda mundial estimula o desenvolvimento de métodos alternativos e sustentáveis para produção do ácido ascórbico. Apesar de os métodos biotecnológicos para a produção dessa vitamina e de intermediários da síntese química de Reichstein e Grüssner serem muito estudados nas últimas décadas, o principal objetivo é a mudança total da síntese química para um processo biotecnológico eficiente, utilizando uma matéria-prima de baixo custo.

12.3. Vitaminas lipossolúveis

As vitaminas lipossolúveis A, D, E e K seguem o mesmo mecanismo de absorção dos lipídios. Para essas vitaminas serem absorvidas, elas precisam ser emulsificadas e incorporadas em micelas contendo colesterol, fosfolipídios e ácidos graxos. As micelas são absorvidas pelos enterócitos intestinais via difusão passiva ou transportadores específicos. As vitaminas lipossolúveis são reorganizadas em quilomícrons que são liberados no sistema linfático. Tais quilomícrons são então hidrolisados pela lipase librando as vitaminas nos tecidos.

As vitaminas lipossolúveis exercem um papel essencial em vários tecidos, na retina, no sistema nervoso, revestimentos epiteliais, em células do sistema imunológico e ossos. A ingestão ou absorção inadequada dessas vitaminas pode conduzir a um número de complicações clínicas graves em todas as fases do ciclo da vida humana.

As vitaminas A, D, E e K ganharam a atenção do mercado no desenvolvimento de produtos enriquecidos, com o objetivo de garantir à população infantil o suprimento necessário para o crescimento e desenvolvimento de funções biológicas. Em relação aos adultos, jovens e crianças são muito sensíveis às variações de vitaminas lipossolúveis, pois não possuem muitas reservas quando nascem, estão em rápido crescimento e possuem alta taxa de diferenciação celular, necessitando assim de alto consumo destes nutrientes.

Entre as vitaminas lipossolúveis, alguns avanços foram obtidos na produção biotecnológica das vitaminas E (α-tocopherol) e K_2 (menaquinona), que serão abordadas nos subitens a seguir.

12.3.1. Vitamina E (α-tocoferol)

A vitamina E abrange um grupo de compostos lipossolúveis denominados tococromanóis. O valor nutricional dos tococromanóis foi reconhecido há mais de 80 anos e este grupo divide-se em 8 tipos de isoformas; (α, β, γ e δ) tocotrienol e (α, β, γ e δ) tocoferol (Figura 12.9). Dentre entes o α- tocoferol é o mais abundante e também possui a maior atividade antioxidante *in vivo*. Na natureza, apenas organismos fotossintéticos são capazes de produzir esta vitamina. Nos humanos, acredita-se que o tocoferol exerce um papel importante na prevenção de doenças de pele e olhos causadas pela radiação ultravioleta, e distúrbios degenerativos como aterosclerose, doenças cardiovasculares e câncer. A aplicação industrial do α-tocoferol ocorre na

preservação de alimentos, cosméticos e protetores solares. Atualmente o α-tocoferol é obtido através da síntese química ou extração de óleos vegetais. Contudo a extração realizada com óleos não é eficiente, pois os níveis de α-tocoferol são baixos.

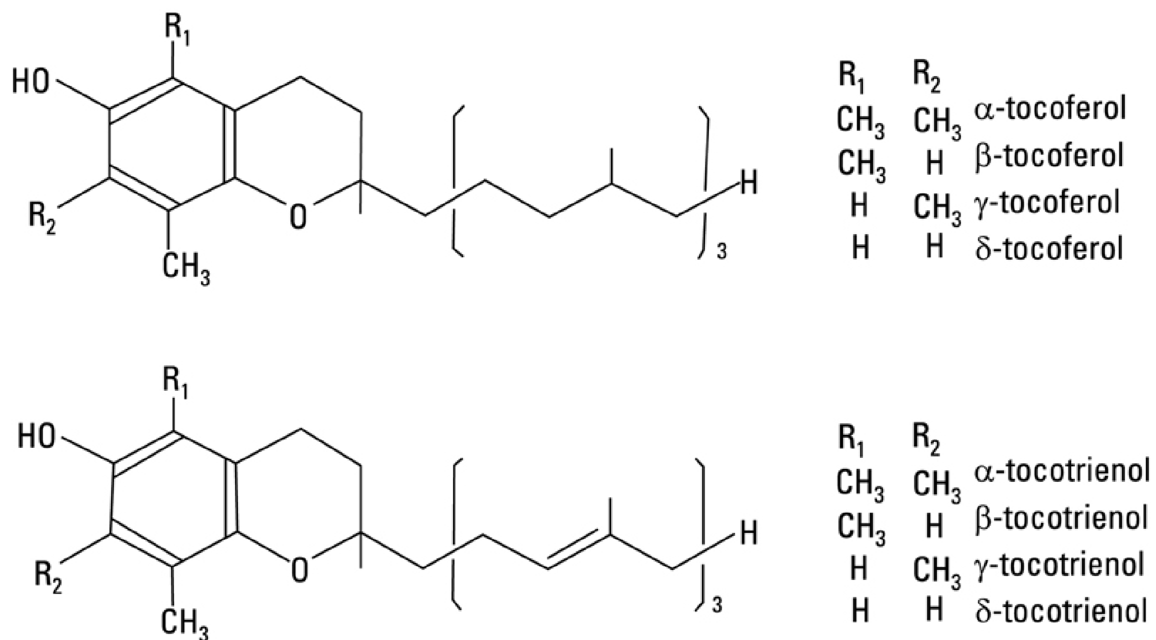


FIGURA 12.9 Estrutura química das 8 isoformas da vitamina E.

Fonte: Adaptado de Vandamme (1989).



FIGURA 12.10 **Produção de *RRR*-α-tocoferol em biorreatores de 5 litros descrito no trabalho realizado por Sivakumar *et al.* (2014).**

Em relação à produção microbiana de α-tocoferol, a cianobactéria *Synechocystis* é considerada um modelo para a identificação de inúmeros genes envolvidos na síntese de α-tocoferol.

Nos últimos anos algumas linhagens de microalgas estão sendo estudadas para a produção de α-tocoferol. O protista eucariótico *Euglena gracilis* Z e a microalga *Dunaliella tertiolecta* são capazes de produzir quantidades de α-tocoferol em concentrações maiores que alimentos tradicionalmente considerados fontes ricas em vitamina E. Desta forma, tais micro-organismos, principalmente *E. gracilis* Z, têm sido estudados em pesquisas envolvendo otimização de meios de cultivo, cultivo em várias etapas e seleção de substratos que aumentem não apenas o crescimento dos micro-organismos, mas também a produção da vitamina.

Os estudos recentes para a produção de α-tocoferol relatam que durante o processo de crescimento das microalgas, a densidade celular elevada causa uma diminuição da penetração da luz para cada uma das células, diminuindo a atividade fotossintética. Isto por sua vez diminui as condições aeróbicas e aumenta o teor de vitamina E.

Outra estratégia eficiente reportada por Takeyama *et al.* (1997) foi a produção simultânea de β-caroteno, vitamina C e vitamina E utilizando também *E. gracilis* Z em um cultivo de duas etapas (foto-heterotrofico e foto-autotrófico). Tal cultivo em duas etapas alcançou uma alta produtividade de vitaminas antioxidantes.

Grimm *et al.* (2015) utilizaram a ideia de biorrefinaria para aproveitar o potencial de *E. gracilis* Z para produção de tocoferol e outros biocompostos. Assim os autores utilizaram dois tipos de cultivo (heterotrófico e fotoautotrófico). No primeiro caso, a microalga foi capaz de produzir 5,3 mg L^{-1} de α-tocoferol, 9,3 mg L^{-1} de paramilo (carboidrato similar ao amido) e 805 mL de biogás g_{vs}^{-1} (por grama de sólidos voláteis). No cultivo fotoautotrófico, 8,6 mg L^{-1} de α-tocoferol, 0,78 mg L^{-1} de paramilo e 648 mL de biogás g_{vs}^{-1} foram produzidos, demonstrando o potencial deste protista para o desenvolvimento de uma biorrefinaria, já que foram obtidos altos redimentos de biomassa, altas concentrações dos bioprodutos alvo e rendimentos de biogás promissores com alta proporção de metano.

Um recente e interessante estudo envolvendo a produção de vitamina E em escala laboratorial foi realizado por Sivakumar *et al.* (2014), que produziram o *RRR*-α-tocoferol utilizando a microalga *Stichococcus bacillaris*. O *RRR*-α- -tocoferol é a forma molecular com maior bioatividade e pode ser sintetizada em organismos fotossintéticos como um único estereoisômero. Neste estudo, os autores utilizaram biorreatores de 5 litros, e no processo de produção da biomassa, adicionaram metil jasmonato, que aumenta a atividade da enzima tirosina aminotransferase, envolvida nas etapas iniciais da biossíntese de α-tocoferol. Desta forma os autores conseguiram aumentar em 0,6 mg g^{-1} (peso seco) a quantidade de α-tocoferol produzida.

A viabilidade do desenvolvimento de um processo para a produção biotecnológica de α-tocoferol, utilizando microalgas, bactérias geneticamente modificadas ou plantas, depende de inúmeros fatores, como, por exemplo, o nível final de α-tocoferol no tecido alvo, o valor do isômero puro de α-tocoferol quando comparado à mistura racêmica de α-tocoferol, a evolução do preço futuro de recursos petroquímicos e síntese química, bem como a evolução da tecnologia de processamento e aceitação pública. Embora um grande número de produtos derivados de aplicações biotecnológicas tenha sido introduzido no mercado durante as duas últimas décadas, produtos biotecnológicos não-médicos são muitas vezes vistos com intenso rigor, principalmente pela comunidade europeia, desestimulando investimentos em pesquisa e desenvolvimento nesse setor.

12.3.2. Vitamina K_2 (menaquinona)

A vitamina K foi descoberta pelo bioquímico dinamarquês Henrik Dam, que observou hemorragia em galinhas que tinham uma dieta livre de gorduras. Assim, em 1935, Dam relatou que a hemorragia era aliviada pela ingestão de uma substância presente na gordura, nomeando tal substância como vitamina K, primeira letra da palavra *Koagulation* em dinamarquês. A vitamina K pode ser encontrada em alimentos animais e vegetais, com maior concentração em folhas verdes escuras.

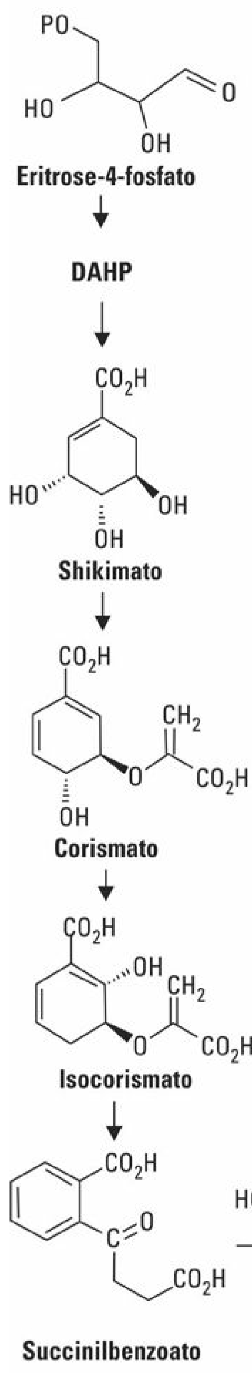
A vitamina K pode ser dividida em 4 classes: Filoquinona (vitamina K_1), presente em óleos vegetais e hortaliças, Dihidrofiloquinona (dK), formada durante a hidrogenação comercial de óleos vegetais, Menadiona (vitamina K_3), composto sintético que é convertido em menaquinona no intestino, e a Menaquinona (vitamina K_2), sintetizada por bactérias, que pode variar de MK_4 a MK_{13} (vitaminas designadas MK-n, sendo n o número de resíduos isoprenoides). Devido ao seu potencial biotecnológico, a menaquinona será abordada neste capítulo.

As funções da vitamina K, incluindo filoquinona e menaquinona, são: proteção do tecido ósseo (reduzindo a perda de massa óssea e fraturas), redução de distúrbios no sistema nervoso como a doença de Alzheimer, atividade antioxidante e é fator essencial na coagulação do sangue. Nas últimas décadas, a vitamina K atraiu cada vez mais o interesse do mercado de suplementos para humanos, assim, alguns micro-organismos como *Flavobacterium* sp., *Bacillus subtilis* e *Propionibacterium freudenreichii* foram descritos pela literatura como potenciais produtores de menaquinona. Entretanto, ainda não existe um modelo de engenharia metabólica para a produção desta vitamina.

Os primeiros estudos para a produção microbiana de menaquinona foram realizados por pesquisadores japoneses da Universidade de Kyoto, que utilizaram uma linhagem mutante de *Flavobacterium* sp. capaz de produzir 182 mg mL^{-1} em meio suplementado com óleo essencial da madeira de cedro. Os autores verificaram que a adição desse óleo foi efetiva para a produção de MK_4, funcionando como percursor da cadeia lateral da menaquinona e como indutor da prenil transferase que catalisa a elongação da cadeia de compostos isoprenoides.

Em relação às linhagens de *Bacillus subtilis*, os trabalhos que utilizam essa bactéria geralmente isolam o micro-organismo do "*natto*" (Figura 12.11), comida japonesa confeccionada a partir da fermentação de grãos de soja. No processo fermentativo do *natto* ocorre a participação do *B. subtilis*, fazendo com que o alimento alcance uma concentração alta de menaquinona (cerca de 800-900 μg em 100 g do alimento). No *natto* a maior parte de menaquinona é a MK_7 (90-96%) e a menor parte é a MK_6 (3-6%).

Temos, como exemplo, o estudo realizado por Sato *et al.* (2000) que isolaram uma linhagem de *Bacillus subtilis* presente em *natto* comercial. Essa linhagem alcançou uma produção máxima de menaquinona de 60 mg L^{-1} em escala laboratorial.







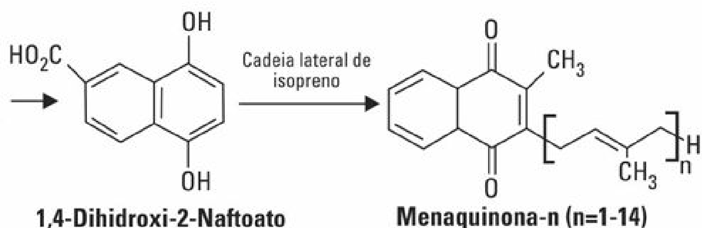


FIGURA 12.11 **Rota biossintética para a produção de menaquinona e alimentos considerados ricos em vitamina K.**
Fonte: Adaptado de Wu e Ahn (2011).

Recentemente, um estudo realizado por Berenjian *et al.* (2013) demonstrou que a formação de biofilme em culturas estáticas de *Bacillus subtilis natto* não é essencial para a produção de MK_7, já que em cultivo com agitação houve apenas um pequeno decréscimo na produção dessa

vitamina. Essa propriedade, segundo os autores, torna o *Bacillus subtilis natto* um micro-organismo chave para a produção industrial de MK_7, em um processo no qual se poderia utilizar biorreatores com sistema de agitação.

Exemplo de fixação

Otimização da produção de menaquinona utilizando superfície de resposta

O planejamento experimental utilizando superfície de resposta apresenta-se como uma interessante ferramenta para atingir as condições ideais de um processo. Essa metodologia utiliza a modelagem e análise de problemas nos quais as respostas desejadas são influenciadas por vários fatores. A grande vantagem apresentada por essa metodologia é que os fatores são analisados simultaneamente, oferecendo a possibilidade de identificar efeitos sinérgicos e antagônicos entre tais variáveis.

Desta forma, utilizando essa metodologia, Berenjian *et al.* (2011) avaliaram as condições do meio de cultura na produção de menaquinona por *Bacillus subtilis natto*. Neste trabalho os autores observaram que os componentes: extrato de levedura, peptona de soja e glicerol (Figura 12.12) foram os nutrientes mais efetivos para aumentar a produção de MK_7.

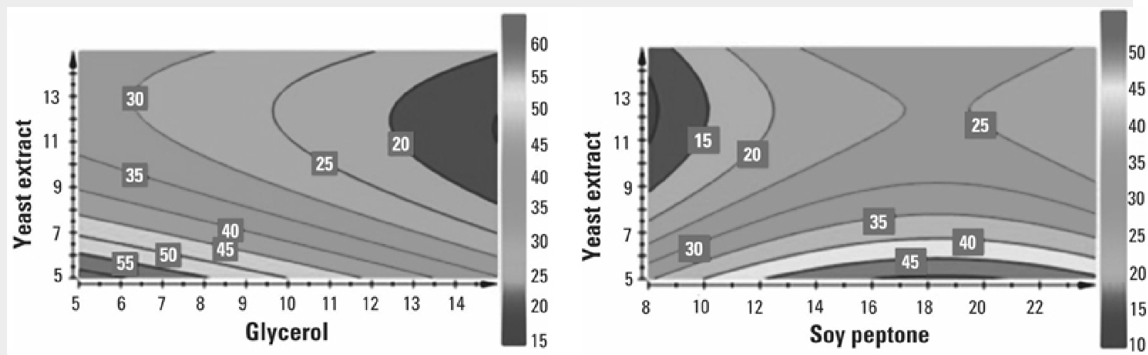


FIGURA 12.12 Superfícies de resposta na produção de MK_7 com os efeitos de extrato de levedura e peptona de soja; glicerol e extrato de levedura. A legenda ao lado das superfícies apresenta as diferentes regiões de interação com as respectivas produções de MK_7 em mg L^{-1}. *Fonte*: Berenjian *et al.* (2011).

A concentração máxima de MK_7 alcançada foi de 62,32 mg L^{-1} após seis dias de fermentação. Esse valor foi o maior já reportado na literatura, comprovando assim o enorme potencial oferecido pelo planejamento experimental usando superfícies de resposta.

A teoria sobre o planejamento experimental utilizando superfícies de resposta apresenta-se muito mais profunda do que o abordado no presente capítulo. Para um melhor entendimento dessa poderosa ferramenta, os autores indicam a leitura do livro "Planejamento de Experimentos e Otimização de Processos" escrito pelos professores Maria Isabel Rodrigues e Antonio Franciso Iemma.

Um estudo interessante, visando a engenharia metabólica de *E. coli* para a produção de menaquinona, foi realizado por Kong e Lee (2011). Neste trabalho, os autores superexpressaram alguns genes envolvidos na biossíntese de menaquinona e obtiveram um aumento de 5 vezes na produção desta vitamina (de 60 µg para 290 µg de menaquinona por grama de peso seco de células) quando comparada à linhagem original.

A produção biotecnológica de menaquinona, assim como das outras vitaminas citadas neste capítulo, apresenta vantagens quando comparadas à síntese química. Além disso, avanços nas áreas de bioquímica e tecnologia do DNA recombinante, juntos com a revolução genômica, têm oferecido inúmeras opções para que a produção microbiana da vitamina K se torne economicamente viável e possa substituir completamente a síntese química em um futuro próximo.

Revisão dos conceitos apresentados

As vitaminas são micronutrientes essenciais para o metabolismo de todos os organismos vivos. Elas são precursoras de coenzimas intracelulares necessárias em reações bioquímicas vitais para a célula. Humanos são incapazes de sintetizar a maioria das vitaminas, obtendo-as de forma exógena.

Atualmente a maioria das vitaminas é produzida via síntese química, processos de extração ou pela combinação de ambos. Em relação à produção via microbiana, seis vitaminas surgem como potenciais competidoras da síntese química: Biotina, Riboflavina (B_2), Cobalamina (B_{12}), Ácido ascórbico (vitamina C), vitaminas E (α-tocopherol) e K_2 (menaquinona) apresentaram resultados promissores na produção biotecnológica em escala laboratorial Tabela 12.2.

As pesquisas desenvolvidas nas últimas décadas, envolvendo a produção biotecnológica de biotina, trabalharam em sua grande maioria utilizando as técnicas de DNA recombinante. Entretanto a grande dificuldade nessa produção é que a biotina, o próprio produto, apresenta ação repressiva nas enzimas presentes na rota metabólica dessa vitamina.

A riboflavina pode ser considerada a vitamina que apresentou os maiores avanços na produção em escala industrial, pois grandes empresas como DSM e a BASF já utilizam micro-organismos para a produção da vitamina B_2. Em relação às recentes pesquisas, destaca-se a técnica do PCR mutagênico, uma interessante estratégia para alcançar mutações não letais no genoma, gerando mutantes para superprodução de riboflavina.

A cobalamina também apresenta produção microbiana industrial bem-sucedida. Rhône-Poulenc é hoje, responsável pela maior produção mundial de vitamina B_{12}, utilizando a via biotecnológica. Atualmente a literatura relata inúmeros estudos com o objetivo de aumentar o rendimento da vitamina B_{12} e apesar de alguns resultados promissores alcançados, o mesmo raciocínio feito para a produção de riboflavina deve ser aplicado neste caso. Assim, abordagens globais como a biologia de sistemas e biologia sintética são interessantes opções para construção de células robustas para a produção de cobalamina.

Dentre todas as vitaminas, o ácido ascórbico é o que possui a maior produção industrial. Cerca de 110 mil toneladas são produzidas anualmente. Nas últimas décadas, inúmeras estratégias biotecnológicas têm sido desenvolvidas para simplificar a síntese de ácido ascórbico utilizando bactérias, leveduras e microalgas. Entretanto, atualmente, uma parte considerável da vitamina C produzida industrialmente ainda é

sintetizada pelo método químico de Reichstein e Grüssner. Assim, o principal objetivo das recentes pesquisas é a mudança total da síntese química para um processo biotecnológico eficiente, utilizando uma matéria-prima de baixo custo.

Em relação à produção microbiana de α-tocoferol, a cianobactéria *Synechocystis* é considerada um modelo para a identificação de inúmeros genes envolvidos na síntese de α-tocoferol. Alguns trabalhos relataram resultados promissores utilizando as microalgas *Stichococcus bacillaris, Dunaliella tertiolecta* e o protista eucariótico *Euglena gracilis* Z para a produção de vitamina E. Um fator importante também é que a viabilidade de um processo para a produção biotecnológica de α-tocoferol depende de inúmeros fatores, como, por exemplo, o nível final de α-tocoferol no tecido alvo, o valor do isômero puro de α-tocoferol quando comparado à mistura racêmica de α-tocoferol, a evolução do preço futuro de recursos petroquímicos e síntese química, bem como a evolução da tecnologia de processamento e aceitação pública.

Nas últimas décadas, a vitamina K atraiu cada vez mais o interesse do mercado de suplementos para humanos, assim, alguns micro-organismos como *Flavobacterium* sp., *Bacillus subtilis* e *Propionibacterium freudenreichii* são descritos pela literatura como potenciais produtores de menaquinona. Um micro-organismo em especial, *Bacillus subtilis natto*, pode ser considerado chave para a produção industrial de menaquinona, pois o maior valor de produção relatado na literatura (62,32 mg L^{-1}) foi alcançado em cultivo utilizando essa bactéria.

A aplicação da biotecnologia na produção de vitaminas e outros biocompostos promove inúmeros benefícios econômicos e ambientais. Os fatores econômicos sempre foram primordiais para a aceitação de um bioproduto ou bioprocesso, entretanto atualmente a sustentabilidade torna-se cada vez mais importante e desempenha um papel fundamental na maioria das organizações modernas. Sem dúvidas a biotecnologia possui um grande potencial para transformar a produção industrial em algo mais compatível com a biosfera.

Tabela 12.1

Vitaminas abordadas neste capítulo com suas respectivas fontes naturais e consumo recomendado

Vitamina	Variações encontradas	Fontes naturais	Consumo diário recomendado para adultos
Biotina	Biotina	Fígado de boi, gema de ovo, vegetais, melaço de cana e flora intestinal	0,3 mg
Vitamina B2	Riboflavina	Fígado de boi, ovo, produtos lácteos, vegetais, carnes e flora intestinal	1,2 - 1,3 mg
Vitamina B12	Cianocobalamina (B12) hidroxicobalamina (B12b), nitrosilcobalamina, (B12c)	Carnes, fígado, leite e flora intestinal	2 μg
Vitamina C	Ácido ascórbico, ácido eritro-ascórbico	Frutas cítricas, frutas, vegetais e batatas	50 μg
Vitamina E	(α, β, γ e δ) tocotrienol e (α, β, γ e δ) tocoferol	Oléos vegetais, fígado, ovo e produtos lácteos	30 mg
Vitamina K	Filoquinona (vitamina K_1), Dihidrofiloquinona (dK), Menadiona (vitamina K3), Menaquinona (vitamina K2)	Fígado, vegetais, flora bacteriana e óleos vegetais	0,1 mg

Tabela 12.2

Vitaminas produzidas por métodos biotecnológicos

Vitamina	Método biotecnológico		Estágio de produção atual
	Principais micro-organismos	**Método**	
Biotina	Serratia marcescens, Escherichia coli e Bacillus subtilis	Produção fermentativa a partir de glicose utilizando linhagens recombinantes	Escala laboratorial
Riboflavina (B2)	Bacillus subtilis, Candida famata e Ashbya gossypii	Produção fermentativa a partir de glicose	Escala Industrial
Cobalamina (B12)	Pseudomonas denitrificans e Propionibacter shermani	Produção fermentativa a partir de glicose	Escala Industrial
Ácido Ascórbico (Vitamina C)	Gluconobacter oxydans, Ketogulonicigenium vulgare e Bacillus megaterium	Processo fermentativo para a produção de ácido 2-ceto-L-gulônico, o qual é convertido quimicamente para ácido ascórbico	Escala Industrial
	Candida albicans e Saccharomyces cerevisiae	Processo fermentativo para produção de ácido eritro-ascórbico (D-EAA)	Escala laboratorial
	Chlorella pyrenoidosa	Produção fermentativa a partir de glicose	Escala laboratorial
Vitamina E (α-tocoferol)	Euglena gracilis Z e Dunaliella tertiolecta	Produção fermentativa a partir de glicose	Escala laboratorial
Vitamina K2 (Menaquinona)	Flavobacterium sp., Bacillus subtilis natto, e Propionibacterium freudenreichii	Produção fermentativa a partir de glicose e extrato de soja	Escala laboratorial

Questões

1. Discuta quais as vantagens e desvantagens tecnológicas e nutricionais de produzir vitaminas por via biotecnológicas?
2. Com a leitura do texto, pode-se identificar quais as vitaminas já produzidas por processos biotecnológicos e quais ainda não são. Faça uma tabela identificando as vitaminas, o processo industrial majoritário de produção e o preço de mercado. O processo define a disponibilidade e o custo?
3. Qual o principal desafio na produção biotecnológica de ácido ascórbico? Como tem sido superado este desafio?
4. Escolha uma vitamina. Calcule numa dieta padrão, quanto desta vitamina está adicionada aos alimentos processados. Escolha um suplemento vitamínico comercial na farmácia e veja o teor desta vitamina para consumo diário. Calcule a ingestão potencial diária desta vitamina por um adulto. Discuta com a classe a relevância da suplementação de vitaminas em alimentos processados.

5. Muitas vitaminas possuem efeito nutricional e também podem ser usadas como coadjuvantes tecnológicos. Cite alguns exemplos ilustrando com processamentos.
6. O modo como se veicula a vitamina nos alimentos está relacionado com a matriz deste alimento. No entanto, nem sempre esta é a melhor forma de assimilação ou absorção desta vitamina. Como ocorre a escolha dos alimentos que são fortificados com vitaminas solúveis e insolúveis?

Tópicos Para Discussão

Atualmente a humanidade sente os efeitos dos problemas ambientais provocados ao longo de centenas de anos. O uso desordenado e inconsequente da natureza e seus recursos ocasionou inúmeros problemas como a poluição do ar, água e solo, desmatamento, aquecimento global, diminuição da camada de ozônio, etc.

Desta forma, o desenvolvimento sustentável virou um tema essencial. No âmbito empresarial, a sustentabilidade é a capacidade que os fabricantes têm de satisfazer a demanda do mercado atual ao mesmo tempo em que mantêm a capacidade de atender tais necessidades no futuro. Para isso é necessário reduzir a taxa em que os recursos naturais são utilizados, diminuir a quantidade de poluição criada, proporcionando produtos suficientes, como alimentos, de forma a satisfazer as necessidades da população.

Para tanto, a adoção de práticas biotecnológicas pelas empresas é atualmente uma estratégia interessante, já que as mesmas são geralmente mais respeitadoras do meio ambiente do que os métodos industriais tradicionais. Essas tecnologias podem substituir recursos não renováveis por renováveis, trocar produtos químicos por biológicos desenvolvendo processos mais eficazes. Temos como exemplo a produção sintética de vitaminas que apresenta algumas desvantagens como alto consumo de energia, uso de reagentes tóxicos e geração de resíduos, resultando em um processo oneroso e de alto impacto ambiental.

Entretando dentre as inúmeras vitaminas comercializadas mundialmente, poucas apresentam avanços na utilização da biotecnologia no seu processo produtivo. No Brasil os pesquisadores têm desenvolvido um grande volume de trabalhos utilizando a tecnologia de engenharia genética e proteômica. Contudo, a relação entre pesquisa acadêmica e indústria ainda permanece consideravelmente distante no país.

Assim, destaca-se a importância dos incentivos à pesquisa e tecnologia bem como o encurtamento da distância entre a academia e as empresas, para assim viabilizar e aumentar o desenvolvimento da produção sustentável de bioprodutos como vitaminas, enzimas, bioplásticos, bioinseticidas etc.

Sugestões Para Pesquisa

1. Pesquise quais são as principais empresas produtoras de vitaminas atualmente.
2. Quais empresas aplicam a tecnologia da engenharia genética para a produção biotecnológica de vitaminas? Quais são as patentes mais relevantes em relação ao uso da genética nesse processo?
3. Quais são as novas técnicas de isolamento e identificação de micro-organismos produtores de vitaminas?
4. Quais vitaminas ainda possuem baixa exploração do processo biotecnológico? Por quê?
5. Faça uma relação dos pricipais países consumidores e exportadores de vitaminas.
6. Quais são as principais vitaminas utilizadas pela indústria de alimentos no Brasil? Existe alguma legislação específica para a aplicação de vitaminas na produção de alimentos?

Referências

Abalde J, et al. β-Carotene, vitamin C and vitamin E content of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* cultured with different nitrogen sources. *Bioresource Technology*. 1991;38(2):121–125.

Aquarone E. Produção de aminoácidos. In: Lima UA, Aquarone E, Borzani W, Schmidell W, eds. *Biotecnologia Industrial*: *Processos Fermentativos e Enzimáticos*. Vol. 3 São Paulo: Edgard Blücher; 2001:593.

Bacher A, et al. Biosynthesis of vitamin B2 (riboflavin). *Annual Review of Nutrition*. 2000;20(1):153–167.

Berenjian A, et al. Effect of biofilm formation by *Bacillus subtilis natto* on menaquinone-7 biosynthesis. *Molecular Biotechnology*. 2013;54(2):371–378.

Berenjian A, et al. Efficient media for high menaquinone-7 production: response surface methodology approach. *New Biotechnology*. 2011;28(6):665–672.

Bower, S. et al. 2001. Biotin biosynthesis in *Bacillus subtilis*. US Patent n. 6.303.377.

Bremus C, et al. The use of microorganisms in L-ascorbic acid production. *Journal of Biotechnology*. 2006;124(1):196–205.

Choux Inpress Choux 01 by Coyau / Wikimedia Commons. Licensed under CC BY-SA 3.0 via Wikimedia Commons: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Choux_01.jpg#/media/File:Choux_01.jpg.

Demain AL. Microbial biotechnology. *Trends in Biotechnology*. 2000;18(1):26–31.

Dmytruk K, et al. Construction and fed-batch cultivation of *Candida famata* with enhanced riboflavin production. *Journal of Biotechnology*. 2014;172:11–17.

Furuichi K, et al. Aerobic culture of *Propionibacterium freudenreichii* ET-3 can increase production ratio of 1, 4-dihydroxy-2-naphthoic acid to menaquinone. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2006;101(6):464–470.

Gavrilescu M, Chisti Y. Biotechnology – a sustainable alternative for chemical industry. *Biotechnology Advances*. 2005;23(7):471–499.

Grimm P, et al. Applicability of *Euglena gracilis* for biorefineries demonstrated by the production of α-tocopherol and paramylon followed by anaerobic digestion. *Journal of Biotechnology*. 2015.

Takeyama HAH, et al. Production of antioxidant vitamins, b-carotene, vitamin C and vitamin E, by two-step culture of *Euglena gracilis* Z. *Biotechnology Bioengineering*. 1997;53:185–190.

Halver, J.EChapter 6: Fao Corporate Document Repository. The vitamins: Water-soluble vitamins. Disponível em: http://www.fao.org/docrep/x5738e/x5738e07.htm#1.6. Acesso em 16 de junho de 2015.

Hancock RD, Viola R. Biotechnological approaches for L-ascorbic acid production. *Trends in Biotechnology*. 2002;20(7):299–305.

Hong YR, et al. Recombinant *Candida utilis* for the production of biotin. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006;71(2):211–221.

IGEM. 2007 IGEM. 2007. editor. Error prone PCR. Disponível em: http://2007.igem.org/wiki/index.php/Error_prone_PCR. Acesso em 10 de agosto de 2015.

Bier DM, et al. Nutrition for the Primary Care Provider. *Cardiology*. 2015;130(4):201–266.

Kang Z, et al. Recent advances in microbial production of δ-aminolevulinic acid and vitamin B 12. *Biotechnology Advances*. 2012;30(6):1533–1542.

Kanzaki, N. et al. 2001. Microorganism resistant to threonine analogue and production of biotin. US Patent n. 6.284.500.

Kato T, Park EY. Riboflavin production by *Ashbya gossypii*. *Biotechnology Letters*. 2012;34(4):611–618.

Klack K, Carvalho JFD. Vitamin K: metabolism, sources and interaction with the anticoagulant warfarin. *Revista Brasileira de Reumatologia*. 2006;46(6):398–406.

Knorr B, et al. Scale-down and parallel operation of the riboflavin production process with *Bacillus subtilis*. *Biochemical Engineering Journal*. 2007;33(3):263–274.

Kong MK, Lee PC. Metabolic engineering of menaquinone-8 pathway of *Escherichia coli* as a microbial platform for vitamin K production. *Biotechnology and Bioengineering*. 2011;108(8):1997–2002.

Kuivanen J, et al. Metabolic engineering of the fungal D-galacturonate pathway for L-ascorbic acid production. *Microbial Cell Factories*. 2015;14(1):1–9.

Leblanc JG, et al. B-Group vitamin production by lactic acid bacteria–current knowledge and potential applications. *Journal of Applied Microbiology*. 2011;111(6):1297–1309.

Li KT, et al. An effective and simplified pH-stat control strategy for the industrial fermentation of vitamin B12 by *Pseudomonas denitrificans*. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2008;31(60):5–10.

Lim SH, et al. Microbial production of riboflavin using riboflavin overproducers, *Ashbya gossypii*, *Bacillus subtilis*, and *Candida famate*: An overview. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2001;6(2):75–88.

Martens JH, et al. Microbial production of vitamin B12. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2002;58(3):275–285.

Masuda M, et al. Further improvement of D-biotin production by a recombinant strain of *Serratia marcescens*. *Process Biochemistry*. 1995;30(6):553–562.

Moore S, Warren M. The anaerobic biosynthesis of vitamin B12. *Biochemical Society Transactions*. 2012;40(3):581.

Morett E, et al. Systematic discovery of analogous enzymes in thiamin biosynthesis. *Nature Biotechnology*. 2003;21(7):790–995.

Mudimu O, et al. Influence of Different CO2 Concentrations on Microalgae Growth, α-Tocopherol Content and Fatty Acid Composition. *Geomicrobiology Journal*. 2015;32(3-4):291–303.

Natto mixed Inpress Natto mixed by User:Gleam - Taken from ja-wikipedia. Licensed under CC BY-SA 3.0 via Wikimedia Commons: https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Natto_mixed.jpg#/media/File:Natto_mixed.jpg.

Ohara, A. 2014. Isolamento e seleção de leveduras silvestres de biomas do Estado de São Paulo com potencial para produção de lipase e vitaminas do complexo B. 2014. 56 f. Dissertação (Mestrado). Curso de Ciência de Alimentos, Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

Paixão JA, Stamford TL. Vitaminas lipossolúveis em alimentos-uma abordagem analítica. *Química Nova*. 2004;27(1):96–105.

Paniz C, et al. Fisiopatologia da deficiência de vitamina B12 e seu diagnóstico laboratorial. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. 2005;41(5):323–334.

Pappenberger G, Hohmann HP. Industrial production of L-ascorbic acid (Vitamin C) and D-isoascorbic acid. *Biotechnology of Food and Feed Additives*. Springer Berlin Heidelberg; 2013:143–188.

Park EY, et al. The improvement of riboflavin production in *Ashbya gossypii* via disparity mutagenesis and DNA microarray analysis. *Applied microbiology and biotechnology*. 2011;91(5):1315–1326.

Rodrigues MI, Iemma AF. Planejamento experimental e otimização de processos. *Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e Amor*. 2009:3–6.

Rose RC. Transport of ascorbic acid and other water-soluble vitamins. Biochimica et Biophysica Acta (BBA). *Reviews on Biomembranes*. 1998;947(2):335–366.

Said HM. Water-Soluble Vitamins. In: Bier D, ed. *Nutrition for the Primary Care Provider*: *World Review of Nutrition and Dietetics*. 111 Basel: Karger; 2015:30–37.

Sato T, et al. Production of menaquinone (vitamin K 2)-7 by *Bacillus subtilis*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2001;91(1):16–20.

Schenberg ACG. Biotecnologia e desenvolvimento sustentável. *Estudos avançados*. 2010;24(70):7–17.

Seki M. (+)-Biotin: A Challenge for industrially viable total synthesis of natural products. *Studies in Natural Products Chemistry*. 2008;34:265–307.

Silva DDV, et al. Aditivos alimentares produzidos por via fermentativa - parte II: aminoácidos e vitaminas. *Revista Analytica*. 2005;19:62–73.

Sivakumar G, et al. Biomass and RRR-α-tocopherol production in *Stichococcus bacillaris* strain siva2011 in a balloon bioreactor. *Microbial Cell Factories*. 2014;13(1):1–8.

Streit WR, Entcheva P. Biotin in microbes, the genes involved in its biosynthesis, its biochemical role and perspectives for biotechnological production. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2003;61:21–31.

Survase SA, et al. Biotechnological production of vitamins. *Food Technology and Biotechnology*. 2006;44(3):381.

Suzuki GT, et al. Influence of Nitrogen and Carbon Sources on Riboflavin Production by Wild Strain of *Candida* sp. *Food and Bioprocess Technology*. 2012;5(2):466–473.

Suzuki GT, et al. Medium composition influence on Biotin and Riboflavin production by newly isolated *Candida* sp. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2011;42(3):1093–1100.

Tani Y, Taguchi H. Extracellular production of menaquinone-4 by a mutant of *Flavobacterium* sp. 238-7 with a detergent-supplemented culture. *Journal of Fermentation and Bioengineering*. 1989;67(2):102–106.

Valentin HE, Qi Q. Biotechnological production and application of vitamin E: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005;68(4):436–444.

Vandamme EJ. Vitamins and related compounds via micro-organisms: A biotechnological view. *Biotechnology of Vitamins*. Pigments and Growth Factors Springer Netherlands; 1989:1–11.

Vandamme EJ. Production of vitamins, coenzymes and related biochemicals by biotechnological processes. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. 1992;53(4):313–327.

Wang ZJ, et al. Improved vitamin B12 production by step-wise reduction of oxygen uptake rate under dissolved oxygen limiting level during fermentation process. *Bioresource Technology*. 2010;101(28):45–52.

Warm A, et al. Process development implications of biotin production scale-up. *Organic Process Research & Development*. 2003;7(3):272–284.

Wu WJ, Ahn BY. Improved menaquinone (vitamin K2) production in cheonggukjang by optimization of the fermentation conditions. *Food Science and Biotechnology*. 2011;20(6):1585–1591.

CAPÍTULO 13

Produção de Biomoléculas Funcionais em Biorrefinarias

Priscilla Filomena Fonseca Amaral

Tatiana Felix Ferreira

Conceitos apresentados neste capítulo

Este capítulo define biorrefinaria e discute possíveis rotas de obtenção de intermediários químicos que estão inseridos no conceito de biorrefinaria. Sendo assim, neste capítulo são apresentadas algumas biomoléculas funcionais como os ácidos orgânicos e os dióis, também conhecidos como glicóis. Dentre os ácidos orgânicos possíveis de se sintetizar em uma biorrefinaria destacam-se o ácido láctico, o ácido succínico e o ácido 3-hidropropiônico. Dentre os dióis merecem destaque o 1,3-propanodiol, o 2,3-butanodiol e 1,4-butanodiol. Acerca dessas biomoléculas funcionais citadas, serão abordados características, aplicações, micro-organismos capazes de sintetizar, substratos e/ou matérias-primas utilizadas na biotransformação e as rotas bioquímicas de produção. As moléculas estudadas neste capítulo são consideradas estratégicas, pois, dentre outras aplicações, servem como precursoras de uma série de polímeros com demanda crescente no mercado global.

13.1. Introdução

Recursos convencionais, principalmente combustíveis fósseis, estão tornando-se limitados por causa do rápido aumento na demanda de energia. Este desequilíbrio na demanda e oferta de energia tem resultado em uma enorme pressão não só sobre os preços para o consumidor, mas também sobre o meio ambiente, o que leva a humanidade a procurar fontes de energia sustentáveis. A biomassa é um recurso renovável a partir do qual diversos produtos químicos e combustíveis podem ser produzidos. Um sistema semelhante a uma refinaria de petróleo é necessário para produzir combustíveis e produtos químicos a partir de biomassa e é conhecido como um biorrefinaria (Fernando *et al.*, 2006). Sendo assim, biorrefinaria é um termo que se refere ao uso de matérias-primas renováveis e de seus resíduos (denominados de forma geral como biomassas), de maneira integral e diversificada, para a produção, por rota química ou biotecnológica, de uma variedade de substâncias e energia, com a mínima geração de resíduos e emissões de gases poluidores (Pereira Jr., 2006).

O objetivo da biorrefinaria é transformar os materiais biológicos existentes em abundância em produtos utilizáveis nas indústrias de transformação, usando uma combinação de tecnologias e processos biotecnológicos como mostra a Figura 13.1.

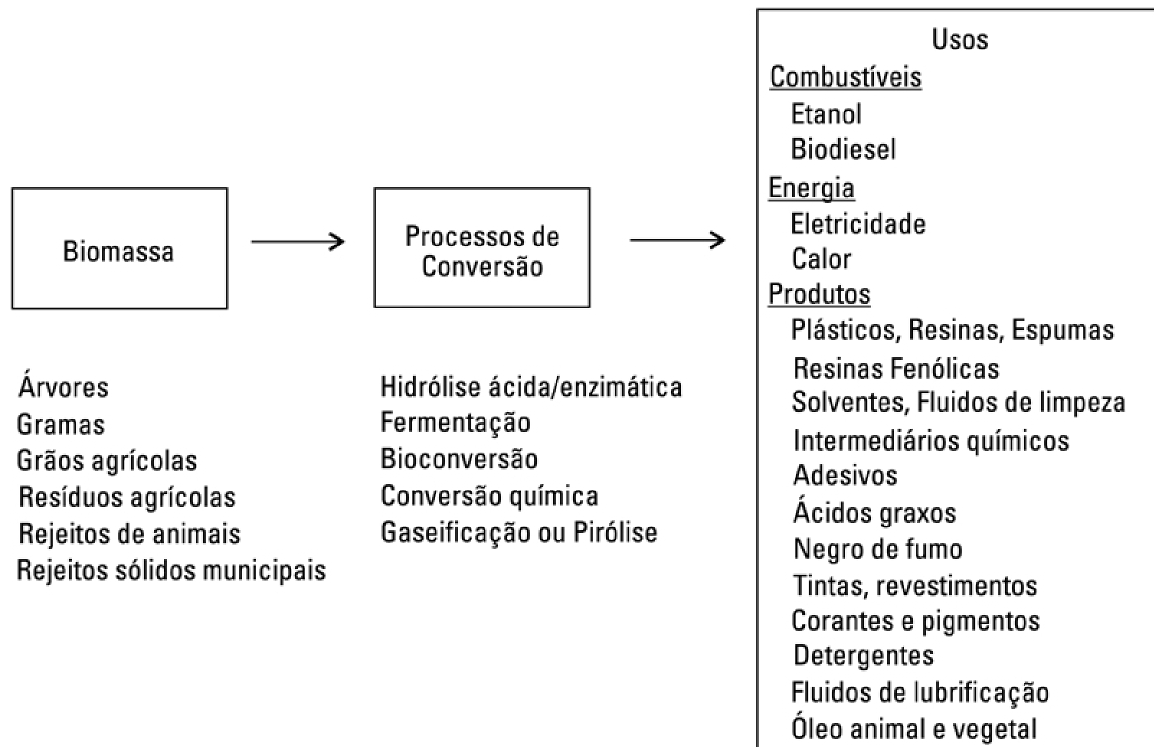


FIGURA 13.1 Esquema de uma biorrefinaria apresentando os três níveis: biomassa, processo e produto. *Fonte*: Adaptado de Fernando *et al.* (2006).

O termo biorrefinaria foi criado na década de 1990, quando a utilização de recursos renováveis para a produção de químicos ganhou atenção por parte da indústria. Os primeiros projetos focaram na fabricação de combustíveis, solventes, intermediários químicos e plásticos. Em alguns países esses produtos são obtidos a partir de resíduos de biomassa. No início, os principais processos em uma biorrefinaria envolviam a produção de etanol, ácido láctico, propanodiol e lisina, todos por fermentação. O etanol é utilizado como combustível e os demais utilizados na obtenção de polímeros (poli(ácido láctico), polímeros derivados de propanodiol, polilisina). Em seguida, esses biopolímeros foram completados com os polihidroxialconoatos e óleo polimerizados (Kamm *et al.*, 2006).

A biorrefinaria de hoje visa produzir uma série de produtos já destacados na Figura 13.1. Esses produtos podem ser classificados em diferentes categorias: *commodities* - produtos comercializados em grandes escalas de produção e baixo valor de mercado – exemplos: os biocombustíveis e plásticos biodegradáveis; moléculas intermediárias — produtos comercializados em escala intermediária e que apresentam valor de mercado – exemplos: ácido succiníco e ácido lático; e especialidades químicas – produtos comercializados em pequena escala e que apresentam

grande valor de mercado – exemplos: ingredientes funcionais e produtos farmacêuticos (Santos, 2011).

Mais adiante serão destacadas algumas moléculas intermediárias como os ácidos orgânicos e os dióis, que são dois grupos representativos das biomoléculas funcionais. Biomoléculas são compostos químicos sintetizados por seres vivos. Uma vez que essas moléculas apresentam grupos funcionais que lhes conferem certas características, podendo ser usadas em reações de síntese, são consideradas biomoléculas funcionais. No caso dos grupos citados anteriormente, os grupos funcionais das biomoléculas são, respectivamente, a carboxila e a hidroxila.

13.2. Ácidos orgânicos

Muitos metabólitos naturais, tais como ácidos carboxílicos, aminoácidos e dióis com grupos funcionais adequados para a polimerização podem ser utilizados na síntese química de polímeros. Durante as últimas décadas, os processos de fermentação e processos de síntese enzimática para a produção desses monômeros foram alvo de estudos, incluindo a engenharia metabólica dos micro-organismos (Lee *et al.*, 2004). Dentre os ácidos orgânicos utilizados na síntese de polímeros destacam-se o ácido lático, ácido succínico e ácido 3-hidroxipropiônico.

13.2.1. Ácido lático

O ácido lático (ácido 2-hidroxipropanóico) é um ácido orgânico amplamente distribuído na natureza. É o mais simples 2-ácido hidroxicarboxílico com um átomo de carbono quiral e existe em duas formas enantioméricas (Figura 13.2). O comportamento químico do ácido lático é determinado pelas suas propriedades físico-químicas, como o caráter ácido médio em solução aquosa, a reatividade bifuncional associada à presença de um grupo carboxílico e um grupo hidroxila, o que lhe confere grande versatilidade de reação, e a atividade óptica assimétrica do C2 (Martinez *et al.*, 2013).

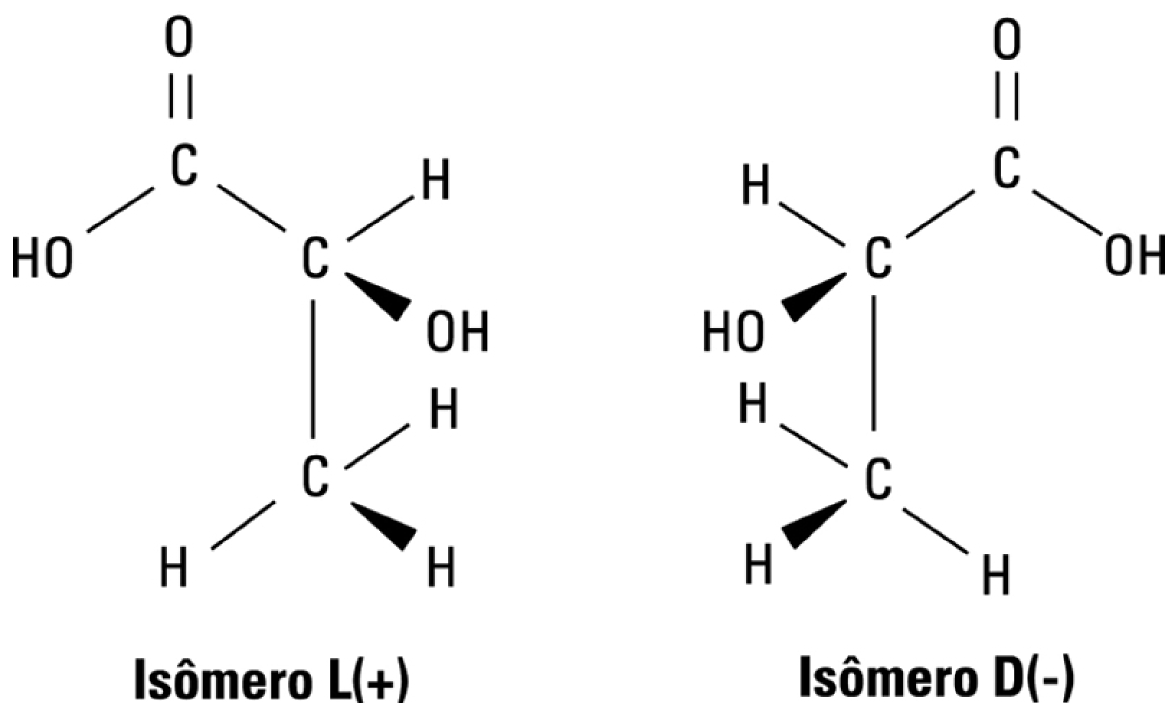


FIGURA 13.2 Estrutura química dos isômeros D(-) e L(+) do ácido lático. *Fonte*: Adaptado de Martinez *et al.* (2013).

Esse ácido é um importante produto industrial, pois é utilizado como um precursor para pequenos (propilenoglicol) ou grandes (polímeros acrílicos) compostos. Como apresenta tanto grupo carboxílico como hidroxila, o ácido lático pode ser convertido em diferentes produtos químicos potencialmente úteis, tais como o ácido pirúvico, o ácido acrílico, 1,2-propanodiol e lactato de etila (Gao *et al.*, 2011). Os polímeros obtidos a partir do ácido lático são biodegradáveis, utilizados como materiais de embalagem e rotulagem, e biocompatíveis, sendo úteis para a obtenção de dispositivos protéticos, suturas e dosagem do medicamento interno (Lipinsky, 1986; Drumright *et al.*, 2000).

Entre os polímeros obtidos, o ácido polilático (PLA) apresenta várias aplicações nas indústrias têxtil, médica e farmacêutica. Existe uma crescente demanda por derivados de PLA que podem substituir materiais plásticos convencionais, bem como ser utilizados em novos materiais para área da saúde (Gao *et al.*, 2011). O PLA é altamente versátil, biodegradável, derivado 100% de recursos renováveis, tais como milho e beterraba (Drumright *et al.*, 2000).

As propriedades físicas do PLA dependem da composição isomérica de ácido lático. Isômeros puros, ácidos L- e D-láticos são mais valiosos do que a forma racémica, porque cada um dos isômeros tem sua própria aplicação industrial específica. O ácido L-lático é utilizado para a síntese de poli

(ácido-L-lático) (PLLA, sigla em inglês), um polímero termoestável, semi-cristalino e biodegradável que tem um grande potencial no mercado de embalagem. PLLA tem alta resistência à tração e baixo alongamento com um módulo elevado que o torna adequado para produtos médicos. O ácido D-lático é utilizado para a produção de ácido poli (ácido D-lático) (PDLA, sigla em inglês). Estes polímeros puros são relativamente sensíveis ao calor e são mais biodegradáveis (Abdel-Rahman *et al.*, 2011).

O propilenoglicol (1,2-propanodiol) é um importante produto químico com uma variedade de usos. Atualmente, é produzido por um processo com óxido de propileno, um petroquímico não renovável. A produção de 1,2-propanodiol pela hidrogenação direta de ácido láctico pode ser uma rota alternativa para o processo à base de petróleo (Gao *et al.*, 2011).

O ácido lático pode ser produzido quer por síntese química ou por fermentação microbiana. Para a síntese química de ácido láctico, pode-se utilizar o acetaldeído em fase líquida sob alta pressão e com cianeto de hidrogênio na presença de uma base. Outras vias químicas de síntese de ácido lático incluem a degradação de açúcares catalisada por base, a oxidação propilenoglicol, o monóxido de carbono e água a uma temperatura e pressão elevadas, a hidrólise de ácido cloropropiônico e oxidação com ácido nítrico de propileno, entre outros (Martinez *et al.*, 2013).

A fermentação lática é relativamente rápida, com rendimentos elevados e pode conduzir, seletivamente, a um dos dois estereoisômeros de ácido lático ou a sua mistura racémica. A síntese química sempre resulta em mistura racémica, que é uma grande desvantagem desta abordagem. Por outro lado, a produção microbiológica do ácido láctico oferece uma vantagem em termos de utilização de carboidratos de biomassa renovável, baixa temperatura de produção, baixo consumo de energia e a produção de ácido lático opticamente puro selecionando uma espécie apropriada. Atualmente, quase todo o ácido lático produzido globalmente é fabricado por fermentação (Martinez *et al.*, 2013; Abdel-Rahman *et al.*, 2011).

A busca de matérias-primas de baixo custo para ser utilizada na produção de ácido lático por fermentação tem promovido o desenvolvimento de processos competitivos. Os materiais mais frequentemente utilizados para este fim podem ser classificados em dois grupos, nomeadamente os monossacarídeos e dissacarídeos e os substratos poliméricos.

Teoricamente, qualquer fonte de carboidrato contendo pentoses ou hexoses poderia ser usada para a produção de ácido lático. Os mono e dissacarídeos podem ser encontrados em subprodutos da indústria de

alimentos, tais como melaço e soro de leite. Melaços têm alto teor de sacarose e são baratos e abundantes, enquanto o soro de leite tem alto teor de lactose cuja eliminação constitui um sério desafio ambiental (Martinez *et al.*, 2013).

Os substratos poliméricos são geralmente polissacarídeos que, na maioria casos, não podem ser diretamente assimilados pelos micro-organismos, exigindo uma fase anterior de hidrólise. Os chamados materiais amiláceos contêm amido, um biopolímero de unidades de glicose. Preparações de glicose obtidas a partir de materiais amiláceos requerem a liquefação do material por α-amilase termoestável e subsequente sacarificação por α-amilase e amiloglucosidase. As soluções de glicose resultantes podem ser utilizadas diretamente como fonte de carbono para produzir ácido lático. Estes materiais também podem ser fermentados por alguns micro-organismos diretamente, sem qualquer fase de hidrólise preliminar, devido à capacidade para libertar amilases extracelulares. A biomassa lignocelulósica, a mais abundante fonte global de carbono, é principalmente composta de celulose, hemicelulose e lignina, as quais formam aproximadamente 90% da matéria seca. Materiais lignocelulósicos podem ser usados para obter soluções de açúcares que podem ser utilmente exploradas para a produção de ácido lático. No entanto, são necessários pré-tratamentos para quebrar a estrutura lignocelulósica, e hidrólise enzimática para despolimerizar a lignocelulose em açúcares fermentáveis. Nos últimos anos, as matérias-primas lignocelulósicas utilizadas para obter ácido lático são casca de semente de algodão, sabugo de milho, hidrolisados de fibras de milho, hidrolisado de madeira, bagaço de cana-de-açúcar, bagaço de mandioca e farelo de trigo, entre outros (Abdel-Rahman *et al.*, 2011; Martinez *et al.*, 2013).

Fungos e bactérias são os micro-organismos mais amplamente utilizados para a produção de ácido láctico. A principal vantagem da utilização de fungos como agentes de fermentação é a sua capacidade de secretar amilases extracelulares capazes de hidrolisar materiais amiláceos, não requerendo qualquer fase de hidrólise. Além disso, a fácil separação da biomassa devido à formação de micélio reduz custos de *downstream*. Estes fungos geralmente pertencem ao gênero *Rhizopus* e produzem especialmente o isômero L(+). Como matérias-primas têm sido utilizados amido de milho, arroz, batata, trigo e abacaxi, e espigas de milho hidrolisado e resíduos de papel (Martinez *et al.*, 2013).

Bactérias produtoras de ácido lático incluem o tipo selvagem e as geneticamente modificadas. Estes organismos podem ser divididos em 4 produtores principais: bactérias láticas, cepas de *Bacillus*, *Escherichia coli* e

Corynebacterium glutamicum. As limitações da fermentação lática bacteriana incluem a produção de ambos isômeros L(+) e D(-) através da L-lactato desidrogenase (L-LDH) e da D-lactato desidrogenase (D-LDH), respectivamente. O baixo rendimento devido à formação de subprodutos e o uso de meios nutricionalmente ricos são também desvantagens do processo que faz uso de bactérias produtoras de ácido lático. Adicionalmente, o elevado risco de infecção por bacteriófago nesses processos resulta em lise celular e subsequente cessação da produção de ácido láctico (Abdel-Rahman *et al.*, 2013). Mesmo assim são frequentemente utilizadas para produção de ácido lático.

As principais vias para o metabolismo das hexoses e pentoses por bactérias ácido láticas são indicadas na Figura 13.3. Essas bactérias são agrupadas em homofermentativas ou heterofermentativas com base no produto final de fermentação. As homofermentativas possuem enzimas aldolase e produzem ácido lático como o principal produto final, sendo de interesse para produção de ácido lático em escala comercial. As espécies mais comuns desse grupo são: *Lactobacillus acidophilus, L. amylophilus, L. bulgaricus, L. helveticus* e *L. salivarius.* Por outro lado, as heterofermentativas produzem subprodutos, além de ácido láctico e, portanto, o rendimento máximo de ácido láctico em relação à glicose é inferior. As bactérias heterofermentativas usam a via das pentoses fosfato alternativa, convertendo açúcares 6-carbono (hexoses) em açúcares de 5 carbonos (pentoses) e dióxido de carbono. Em seguida, a pentose resultante é clivada em gliceraldeído 3-fosfato e fosfato de acetila por phosphoketolase. A maioria das cepas heterofermentativas convertem os açúcares pentose em ácido lático e seus derivados (por exemplo, ácido acético), através de vias fosfocetolase com um rendimento de ácido lático máximo de 0,6 g de ácido láctico por grama de pentose (Abdel-Rahman *et al.*, 2013).

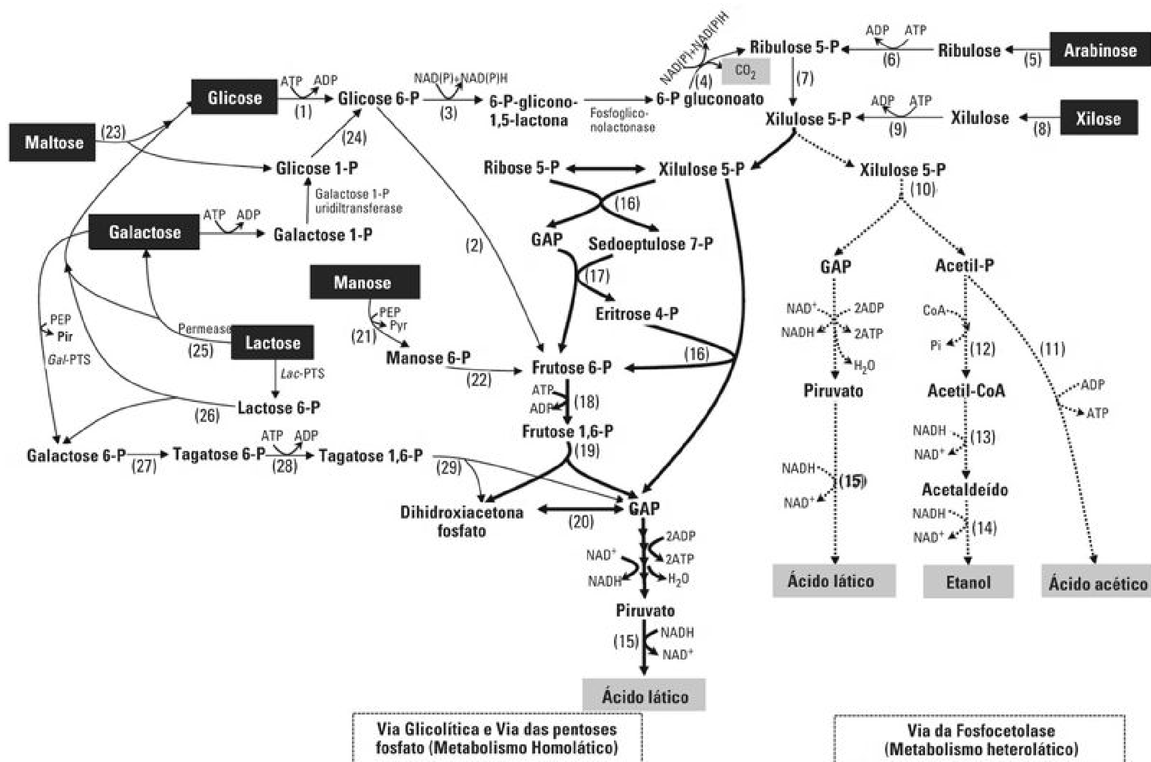


FIGURA 13.3 Vias metabólicas para produção de ácido láctico a partir de vários açúcares por bactérias ácido láticas. Enzimas: (1) hexoquinase; (2) glicose 6-fosfato isomerase; (3) glicose 6-fosfato desidrogenase; (4) 6-fosfogluconato desidrogenase; (5) arabinose isomerase; (6) ribuloquinase; (7) ribulose 5-fosfato de 3-epimerase; (8) xilose isomerase; (9) xiluloquinase; (10) fosfocetolase; (11) quinase de etila; (12) fosfotransacetilase; (13) aldeído desidrogenase; (14) álcool desidrogenase; (15) lactato desidrogenase; (16) transcetolase; (17) transaldolase; (18) 6-fosfofrutoquinase; (19) frutose aldolase bisfosfato; (20) triosefosfato isomerase; (21) sistema manose fosfotransferase; (22) fosfomanose isomerase (23) maltose fosforilase; (24) fosfoglucomutase; (25) β-galactosidase; (26) fosfo-β-galactosidase; (27) galactose-6-fosfato-isomerase; (28) tagatose 6-fosfato-quinase; e (29) tagatose aldolase 1,6-difosfato. As linhas cheias indicam o caminho da via homofermentativa e linhas sólidas grossas indicam via das pentoses e via glicolítica e linhas tracejadas indicam e via fosfocetolase. *Fonte*: Adaptado de Abdel-Rahman *et al.* (2013).

A seleção da forma de condução do processo fermentativo para produção de ácido lático depende do tipo e da natureza do substrato, do crescimento celular e da viscosidade do meio fermentativo. A fermentação em batelada é o processo mais simples e mais utilizado. Apesar da

vantagem de apresentar pouco risco de contaminação devido ao fato de ser um sistema essencialmente fechado e de apresentar elevadas concentrações de ácido lático, a baixa concentração de células não permite uma elevada produtividade em ácido lático devido à limitação das concentrações de substrato e produto decorrente da inibição causada pelos mesmos. A produção de ácido lático mais elevada reportada foi de 192 g/L de ácido lático com 200 g/L de glicose (Abdel-Rahman *et al.*, 2013).

Vários pesquisadores já reportaram que a adição de nutrientes e suplementação com fontes de nitrogênio aumentam a produção de ácido lático. Além disso, a utilização de resíduos para substituir as fontes de nutrientes caras e tradicionais, tem tido bons resultados, como por exemplo a milhocina. Uma produção de 115,1 g/L de ácido lático com produtividade 4,58 g/l/h foi obtida por Yu *et al.* (2008) utilizando milhocina. O aumento do ácido lático não dissociado, devido à diminuição do pH com o aumento da produção de ácido lático, é considerado inibitório para o processo de fermentação. Portanto, alguns trabalhos reportam o uso da estratégia de fermentação extrativa que, com a adição de agentes neutralizantes, consegue formar sal de lactato, “capturando” o ácido lático não dissociado, superando essa inibição e melhorando a eficácia de fermentação. Os agentes de neutralização mais utilizados são: hidróxido de sódio, hidróxido de potássio, hidróxido de cálcio, carbonato de cálcio, ou uma solução de amônio (Abdel-Rahman *et al.*, 2013).

Embora o processo de batelada alimentada seja o processo preferido industrialmente, uma vez que permite uma maior concentração de ácido láctico (226 g/L), sua produtividade é relativamente baixa (≤4.7 g/L/h) (Wang *et al.*, 2011). A batelada repetida após a batelada simples ou alimentada envolve o uso de ciclos repetidos por inoculação de uma parte ou a totalidade das células a partir de uma fermentação anterior. O processo de batelada repetida tem várias vantagens, incluindo aumento do rendimento, redução de tempo “morto” necessário para a limpeza e esterilização do fermentador, obtenção de alta concentração de células e da alta produtividade de ácido lático, e curto tempo de fermentação (Abdel-Rahman *et al.*, 2013).

A produção de ácido lático por processo contínuo também é atrativa devido à redução do problema de inibição pelo produto devido à diluição do meio com a adição de meio fresco. Além disso, elevadas produtividades podem ser obtidas (Abdel-Rahman *et al.*, 2013).

13.2.2. Ácido succínico

O ácido succínico (nome IUPAC: ácido butanodioico) é um cristal incolor solúvel em água, etanol e acetona. É também conhecido como ácido âmbar, uma vez que foi primeiro obtido por destilação âmbar em 1550. Possui ponto de fusão de 185°C e ponto de ebulição de 235°C (Cheng *et al.*, 2012). Sua forma aniônica é o succinato, que constitui um componente do ciclo do ácido tricarboxílico, capaz de doar elétrons para a cadeia transportadora de elétrons. É um ácido dicarboxílico produzido como um intermediário do ciclo dos ácidos tricarboxílicos, ou como produto principal da fermentação anaeróbica por alguns micro-organismos. Sua estrutura química é apresentada na Figura 13.4.

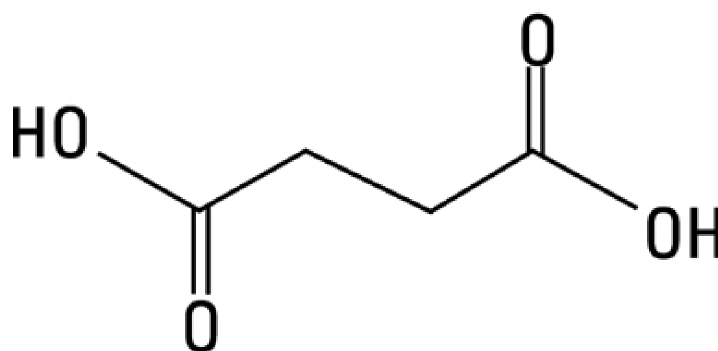


FIGURA 13.4 **Estrutura química do ácido succínico.**

Este ácido orgânico tem sido descrito como um composto de importância estratégica para futuras indústrias químicas baseadas em matérias-primas renováveis, e ele pode ser encontrado na lista de prioridade de compostos obtidos de biomassa, elaborada pelo Departamento de Energia dos EUA.

O motivo para isso é que o ácido succínico tem uma ampla variedade de aplicações industriais (Figura 13.5), tais como intermediário químico para a produção de vernizes e ésteres de perfume, bem como um agente de *flavor*, bacteriostático ou de neutralização na indústria alimentícia. Além disso, o ácido succínico também tem um mercado especial para a produção de revestimentos, agentes tensioativos, corantes, detergentes, solventes e ingredientes estimulantes de crescimento para animais e plantas (Borges, 2011).

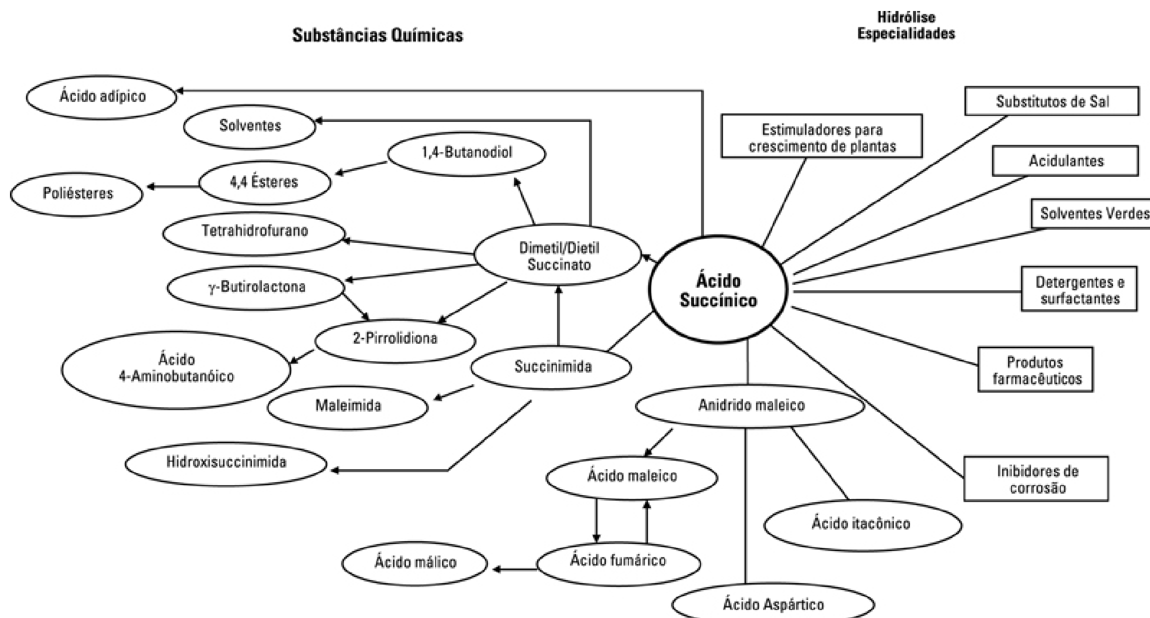


FIGURA 13.5 Produtos obtidos a partir do ácido succínico.
Fonte: Borges (2011).

Com base na estrutura de ácido dicarboxílico linear e saturado, o ácido succínico pode ser prontamente convertido em outros produtos químicos a granel, tal como 1,4-butanodiol, gama-butirolactona, tetra-hidrofurano, ácido adípico, N-metilpirrolidona ou ésteres alifáticos lineares (Cheng *et al.*, 2012).

Além da demanda crescente por aplicações utilizando ácido succínico, seu uso é estendido à síntese de copolímeros biodegradáveis, tais como os poliésteres: PES (polisuccinato de etileno), PBS (polibutilenosuccinato), PBSA (polibutileno succinato adipato) e PBT (polibutilenotereftalado). Polímeros "verdes" são polímeros semelhantes aos polímeros sintéticos de origem petroquímica, mas que empregam matérias-primas renováveis. Nesse sentido, são exatamente iguais aos polímeros derivados do petróleo, polimerizados da mesma maneira e com as mesmas propriedades (Borges, 2011).

O ácido succínico pode ser produzido por vias químicas, as quais incluem principalmente a oxidação de parafinas, hidrogenação catalítica ou eletro-redução do ácido maleico ou anidrido maleico. Industrializado no início dos anos 1930, o processo de hidrogenação é uma das tecnologias maduras para a produção de ácido succínico por rota química. Apesar do alto rendimento do processo, da pureza e seletividade do ácido succínico obtido, a operação deste processo é complicada, dispendiosa, e pode ter implicações ambientais (Cheng *et al.*, 2012).

Desenvolvimentos recentes na produção de ácido succínico têm sido focados em alternativas biotecnológicas, em particular na utilização de micro-organismos como biocatalisadores e biomassa renovável como matéria-prima. É também notável que o CO_2, gás de efeito estufa, é fixado pelo metabolismo microbiano em ácido succínico, durante a fermentação, proporcionando assim uma vantagem adicional (Song e Lee, 2006).

Como o ácido succínico é um intermediário do ciclo do ácido tricarboxílico (TCA) e um dos produtos finais do metabolismo anaeróbio, ele é sintetizado em quase todas as células microbianas, vegetais e animais. Os organismos mais adequados para a produção eficiente de ácido succínico são os fungos e as bactérias. Os fungos filamentosos mais estudados no processo biológico para a produção de ácido succínico são *Aspergillus niger*, *Aspergillus fumigatus*, *Byssochlamys nivea*, *Lentinus degener*, *Paecilomyces varioti*, *Penicillium viniferum*, além da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Estes organismos produzem ácido succínico como um subproduto metabólico em condições aeróbicas e/ou anaeróbicas. *S. cerevisiae* foi mais estudada entre os fungos por alcançar alta concentração de ácido succínico, no fabrico de vinho. Uma série de suas cepas mutantes foi desenvolvida pela inativação de genes indesejáveis, e algumas delas mostraram níveis aumentados de ácido succínico em comparação com a cepa selvagem (Song e Lee, 2006).

Grande parte das bactérias produtoras de ácido succínico foi isolada do rúmen bovino, porque nesse ecossistema o succinato é usado como um importante precursor para o propionato, que é absorvido através da parede do rúmem e oxidado, fornecendo energia e precursores biossíntéticos para esses animais. As espécies mais comuns são *Actinobacillus succinogenes*, *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Mannheimia succiniciproducens* e *Bacillus fragilis*. O sequenciamento genético e os esforços para desenvolver ferramentas genéticas levaram à aplicação de engenharia metabólica para aumentar o desempenho de bactérias ruminais. Uma desvantagem do uso de bactérias do rúmen como produtoras de ácido succínico é que as espécies contêm várias auxotrofias pois as vitaminas e os aminoácidos são prontamente disponíveis em seu habitat natural. Por conseguinte, meios complexos são necessários para suportar o crescimento destes organismos (Jansen e Gulik, 2014).

Uma estratégia alternativa é utilizar micro-organismos industriais comumente aplicados e geneticamente bem acessíveis que não produzem quantidades significativas de ácido succínico naturalmente, tal como *Escherichia coli*, *Corynebacterium glutamicum* ou *Saccharomyces cerevisiae* e aplicar engenharia metabólica para convertê-los em produtores eficientes.

Várias empresas e consórcios começaram ou estão prestes a começar a produção de ácido succínico em grande escala de produção fermentativa, utilizando diferentes cepas produtoras. DSM/Roquette (Joint Venture Reverdia) construíram uma cepa de *S. cerevisiae* muito boa produtora de ácido succínico, e BioAmber/Mitsui escolheram inicialmente *E. coli* como organismo produtor, mas, mais recentemente, parecem ter mudado para a levedura *Candida krusei*. Isto em contraste com Myriant, que parece ter ficado com *E. coli* como a espécie produtora. BASF/Corbion-Purac (Joint Venture Succinity) isolaram um novo membro da família Pasteur-ellaceae do rúmen bovino e nomearam *Basfia succiniproducens*. Este produtor natural, que tem um alto rendimento de 0,75 mol de ácido succínico por mol de glicose, foi ainda mais otimizado através de análise de fluxo metabólico e subsequente engenharia metabólica (Jansen e Gulik, 2014).

As matérias-primas comumente usadas para produção de ácidos orgânicos em larga escala são açúcares refinados (sacarose, glucose e frutose), amido e melaços de beterraba ou de cana. Muitas pesquisas sobre a produção de ácido succínico também utilizam açúcares puros como substratos, incluindo a lactose, xilose, arabinose, celobiose e outros açúcares redutores. Nestes casos, elevados rendimentos, concentrações e produtividades foram alcançados com *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *A. succinogenes* e cepas modificadas de *Escherichia coli* e *Mannheimia succiniciproducens*.

Com o intuito de baratear o custo desse ácido, sua produção já vem sendo investigada utilizando açúcares obtidos de materiais lignocelulósicos de resíduos agroindustriais. Uma vantagem é que estes têm o potencial de ser mais baratos. Uma desvantagem é que os açúcares presentes nesses materiais são de difícil acesso e, portanto, são necessários pré-tratamentos e hidrólise para liberar os açúcares a partir da celulose e hemicelulose presentes na biomassa vegetal. Como consequência, uma variedade de impurezas e produtos de degradação do açúcar são formados, tais como furfural e 5-hidroximetilfurfural que podem agir como inibidores para os micro-organismos. Técnicas de detoxificação são aplicadas para minimizar esse efeito. Mesmo assim, reportam-se estudos com resultados bastante relevantes, como a fermentação do seguinte: a haste do milho e hidrolisado de cana por *E. coli* modificada; palha de milho hidrolisado, açúcar de bagaço de cana, fibra de milho e hidrolisado de palha por *A. succinogenes*; e hidrolisado de madeira por *M. succiniciproducens* (Cheng *et al.*, 2012; Salvachua *et al.*, 2016).

Destes estudos, *A. succinogenes* é frequentemente um micro-organismo com melhor desempenho em termos de produção, taxa e rendimento de

succinato. Esta espécie produz, em particular, o succinato naturalmente em fermentações mistas em relativamente altas concentrações, em parte devido à sua elevada tolerância à acidez. Além disso, essa espécie não é patogênica, é anaeróbia facultativa que fixa CO_2 e consome uma ampla gama de substratos, incluindo C6 (por exemplo, glucose e galactose) e açúcares C5 (por exemplo, xilose e arabinose). Como a elevada concentração de produto é importante para minimizar os custos de separação/purificação, e como a biomassa lignocelulósica é uma matriz com açúcares C6 e C5, *A. succinogenes* posiciona-se como um candidato promissor para produção industrial de succinato a partir de matérias-primas lignocelulósicas (Salvachua *et al.*, 2016).

Além da fonte de carbono, a disponibilidade de CO_2 tem um grande impacto sobre a formação da biomassa e de produtos. O pH também é um fator chave porque ele afeta a solubilidade de CO_2 no meio, e como consequência influencia a disponibilidade de CO_2 para os micro-organismos. Como diferentes micro-organismos podem tolerar níveis diferentes de CO_2 durante a fermentação, a melhor concentração de CO_2 deve ser obtida para cada micro-organismo e meio utilizado (Cheng *et al.*, 2012).

Toda bactéria produtora de ácido succínico, durante a fermentação, forma uma mistura de ácidos, produzindo quantidades variadas do produto de interesse e de outros subprodutos. A fermentação para obtenção de ácido succínico com *E. coli* pode ser através de processo anaeróbico ou de fase dupla, que consiste no crescimento aeróbio seguido por uma fase de produção anaeróbica. Na fase anaeróbica o fosfoenolpiruvato (PEP) e o piruvato são convertidos em lactato e etanol. As enzimas PEP carboxiquinase e PEP carboxilase atuam na carboxilação do PEP para produzir oxaloacetato (Figura 13.6) (Borges, 2011).

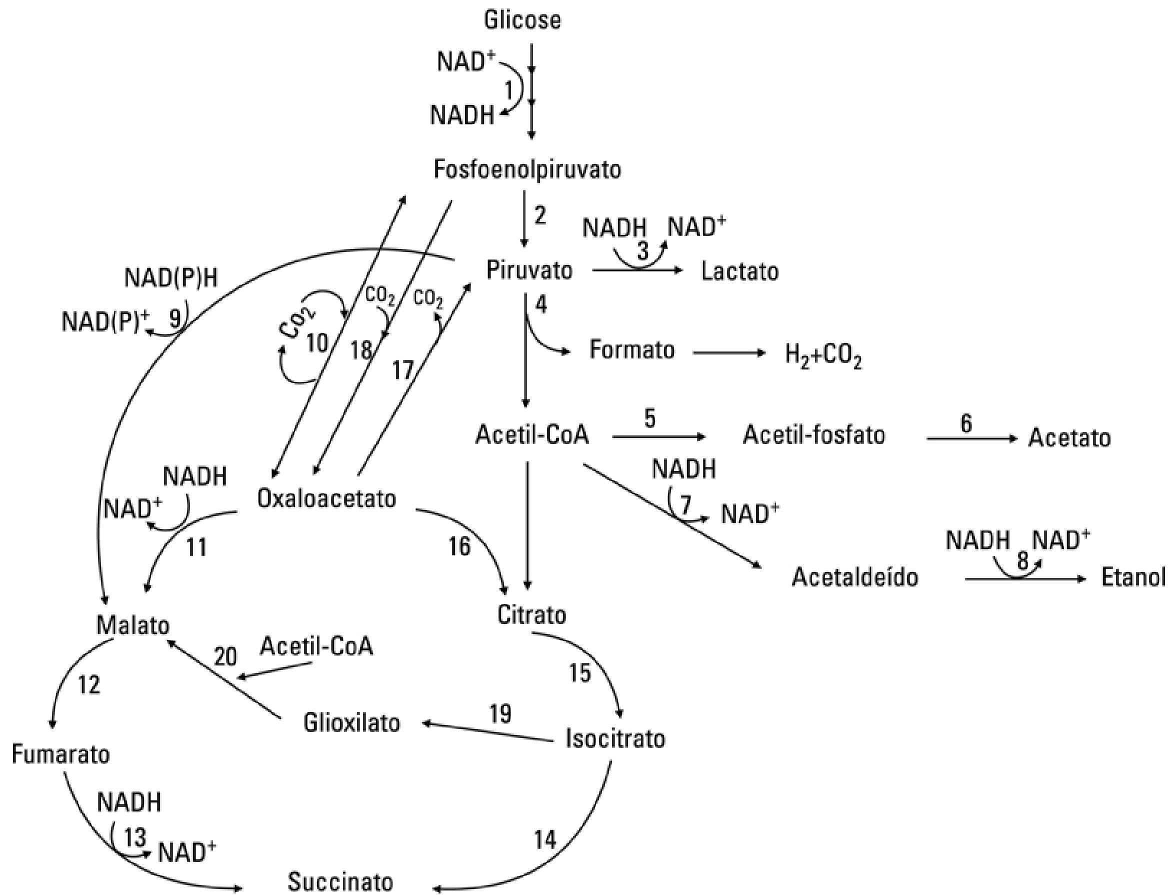


FIGURA 13.6 **Via de ácido succínico de produção em *E. coli*. (1) Enzimas da via Embden-Meyerhof; (2) piruvato-quinase; (3) lactato desidrogenase; (4) piruvato-formato liase; (5) fosfo-transacetilase; (6) acetato quinase; (7) acetaldeído desidrogenase; (8) álcool-desidrogenase; (9) enzima málica; (10) fosfoenolpiruvato carboxilase; (11) malato desidrogenase; (12) fumarase; (13) fumarato redutase; (14) isocitrato liase; (15) aconitase; (16) citrato sintase; (17) oxaloacetate descarboxilase; (18) Fosfoenolpiruvato carboxilase; (19) isocitrato liase; (20) malato sintase.** *Fonte*: Adaptado de Cheng *et al.* (2012).

Já as bactérias *A. succinogenes* e *A. succiniciproducens* utilizam exclusivamente a via PEP carboxiquinase. *A. succinogenes* utiliza quatro enzimas-chaves (PEP carboxiquinase, malato desidrogenase, fumarase e fumarato desidrogenase). A via PEP carboxiquinase é regulada pelo nível de CO_2. Nas bactérias que utilizam esta via a PEP carboxiquinase atua catabolicamente para fixar CO_2, juntamente com ADP, e sintetizar oxaloacetato e ATP a partir do PEP. A concentração de CO_2 regula os níveis das principais enzimas da via PEP carboxiquinase, atuando como

um aceptor de elétrons e alterando o fluxo do PEP, metabolizando piruvato e lactato/etanol em baixos níveis de CO_2, produzindo succinato em altos níveis de CO_2, conforme mostra a Figura 13.7 (Borges, 2011).

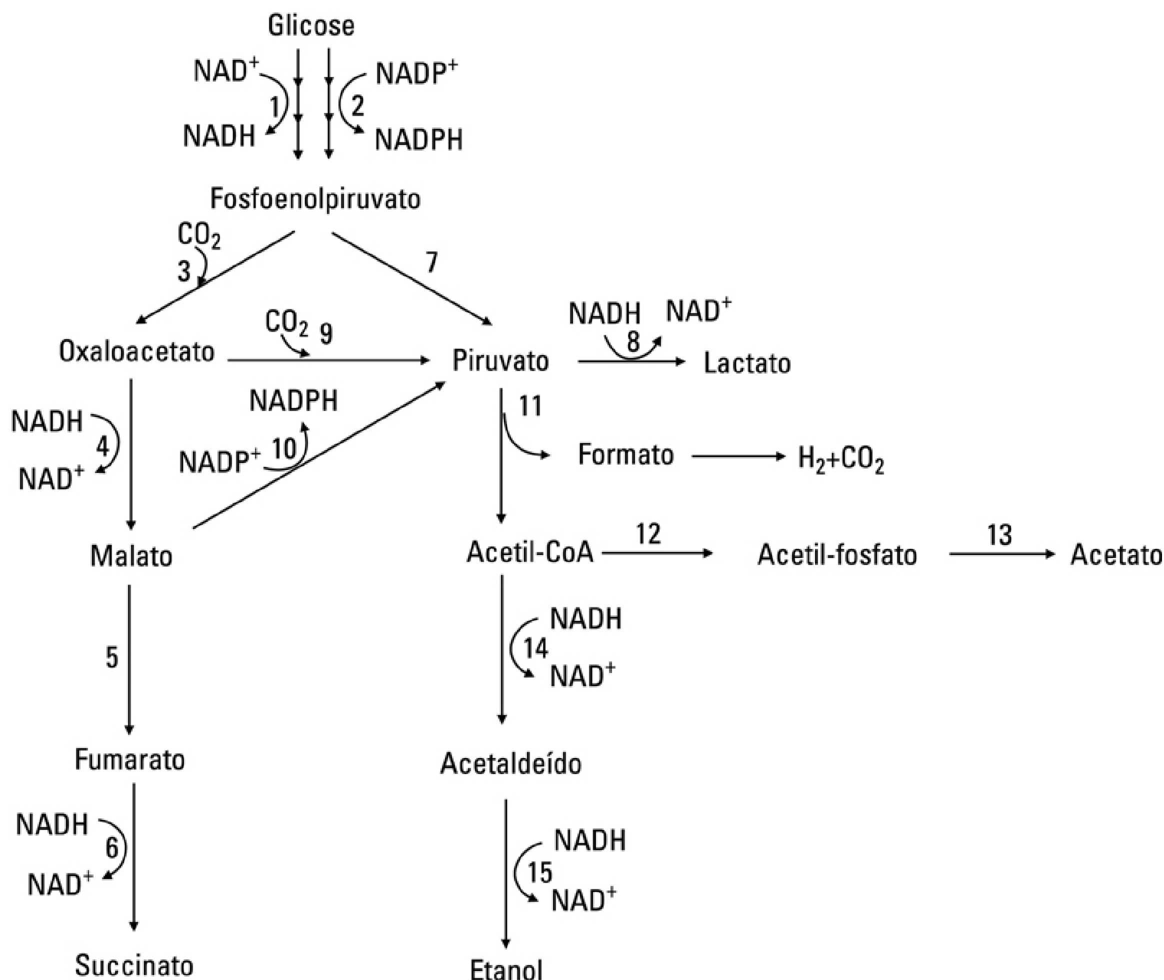


FIGURA 13.7 Via de produção do ácido succínico para *A. succinogenes*. (1) Enzimas da via Embden Meyerhof; (2) enzimas da via das pentoses fosfato; (3) fosfoenolpiruvato carboxicinase; (4) malato desidrogenase; (5) fumarase; (6) fumarato-redutase; (7) piruvato-quinase; (8) lactato desidrogenase; (9) oxaloacetato descarboxilase; (10) enzima málica; (11) piruvato-formato liase; (12) acetato quinase; (13) fosfo-transacetilase; (14) acetaldeído desidrogenase; (15) álcool desidrogenase. *Fonte*: Adaptado de Cheng *et al.* (2012).

A via fermentativa converte oxaloacetato em malato, fumarato e, em seguida, succinato, e esta via requer 2 moles de NADH por cada mol de succinato produzido. Um grande obstáculo à alta produção de succinato

através da via fermentativa é devido à limitação de NADH. Isso ocorre porque 1 mol de glicose pode fornecer apenas 2 moles de NADH através da via glicolítica. No entanto, a formação de um mol de succinato através da via fermentativa nativa requer 2 moles de NADH. Portanto, o rendimento teórico máximo molar de succinato a partir da glicose é limitado a 1 mol por mol de glicose, assumindo que todo o fluxo de carbono irá percorrer a via fermentativa nativa para succinato.

Tendo em vista o alto custo da recuperação do produto, é desejável um produto final com alta concentração e elevado rendimento. Para alcançar isto, a formação de acetato, lactato, formato e etanol deve ser controlada em níveis mínimos. O fluxo de carbono na direção do piruvato deve ser controlado de modo a permitir piruvato necessário como um precursor biossintético. A engenharia metabólica pode ser muito útil na manipulação das vias, de modo que as vias de obtenção dos subprodutos sejam controladas ou mesmo eliminadas. Alterar a atividade de enzimas em torno do PEP, piruvato e OAA também implicaria a redistribuição do fluxo de carbono, que pode trazer uma melhora na síntese de succinato (Cheng *et al.*, 2012).

13.2.3. Ácido 3-hidroxipropiônico

O ácido 3-hidroxipropiônico ou 3-hidroxipropanoato de metila (3-HP) (Figura 13.8) é um composto químico importante como produto de base para a indústria química e que está classificado como o terceiro entre os doze produtos químicos de base selecionados pelo Departamento de Energia dos Estados Unidos que pode ser derivado a partir de biomassa. Quimicamente, o 3-HP é um composto orgânico de três carbonos, opticamente inativos (não quirais) e um isômero estrutural do ácido lático (ácido 2-hidroxipropanoico). O 3-HP também é conhecido como ácido hidroacrílico ou ácido etileno lático (Valdehuesa *et al.*, 2013).

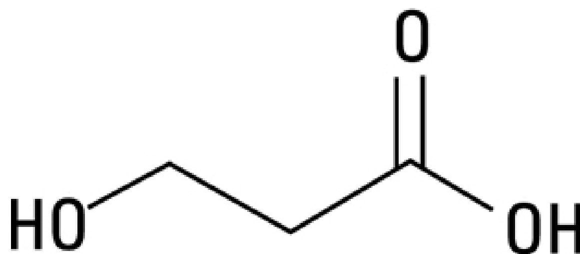


FIGURA 13.8 **Estrutura química do ácido 3-hidroxipropiônico.**

A bifuncionalidade do 3-HP, devido à presença de um grupo carboxílico e outro hidroxila (na posição β), faz com que esse composto seja um agente versátil para a síntese orgânica. O 3-HP pode ser utilizado para a obtenção de produtos químicos, tais como ácido acrílico, 1,3-propanodiol (PDO), acrilato de metila, acrilamida, ácido malônico, propiolactona e acrilonitrilo e pode ser utilizado como um agente de reticulação para os revestimentos de polímero, lubrificantes de metal e agentes antiestáticos para têxteis. Além disso, o 3-HP é um material de partida para reações de ciclização e polimerização para produzir propiolactona, poliésteres e oligômeros. Em particular, o polímero produzido a partir da autocondensação de 3-HP [Poli (ácido 3-hidroxipropiônico)], tem boa biocompatibilidade e biodegradabilidade, e pode ser utilizado para o fabrico de produtos cirúrgicos e materiais de liberação controlada de fármacos. Adicionalmente, o polímero pode substituir muitos polímeros à base de petróleos devido à sua excelente temperatura de transição vítrea e alto ponto de fusão (Kumar *et al.*, 2013).

A produção de 3-HP pode ser realizada utilizando diferentes rotas químicas, a partir de ácido acrílico, 3-propiolactona, 3-hidroxipropionitrilo, álcool alílico, acetato de vinila e 1,3-propanodiol. Embora tenham sido sugeridos muitos processos químicos, nenhum deles é comercialmente viável atualmente devido ao elevado custo da matéria-prima e/ou à incompatibilidade ambiental (Pina *et al.*, 2011; Kumar *et al.*, 2013).

Vários micro-organismos são capazes de produzir 3-HP tanto como intermediários ou como produtos finais. Entre os procariotas, as espécies naturalmente produtoras são: *Lactobacillus* strain, *Lactobacillus reuteri*, *Alcaligenes faecalis*, *Chloroflexus aurantiacus*, *Metallosphaera sedula*, *Lactobacillus collinoides* e *L. reuteri,* e entre os eucariotas tem-se: *Byssochlamys* sp., *Geotrichum* sp., *Trichoderma* sp. e *Saccharomyces kluyveri.*

O bicíclico ciclo do 3-HP em *C. aurantiacus*, juntamente com o ciclo 3–hidroxipropionato/4-hidroxibutirato (4-HB) em *M. sedula,* são apresentados na Figura 13.9 (a e b). O primeiro ciclo de *C. aurantiacus* começa com a acetil-coenzima A (acetil-CoA) e a fixação de duas moléculas de bicarbonato para formar glioxalato. O segundo ciclo começa com propionil-CoA e glioxalato, formando piruvato e acetil-CoA sem qualquer passo redox ou qualquer dissociação de CoA. Por outro lado, o ciclo de 3-HP/4-HB em *M. sedula* fixa o CO_2 quando duas moléculas de bicarbonato são convertidas redutivamente em 4-HB. A principal característica nesses dois ciclos é a formação de 3-HP a partir de acetil-CoA através de uma reação enzimática em dois passos. O 3-HP também é

conhecido por ser um produto na degradação de dimetilsulfoniopropionato por *Alcaligenes faecalis* M3A e a degradação de uracila em leveduras e bactérias (Figura 13.9c e 13.9d) (Valdehuesa *et al.*, 2013).

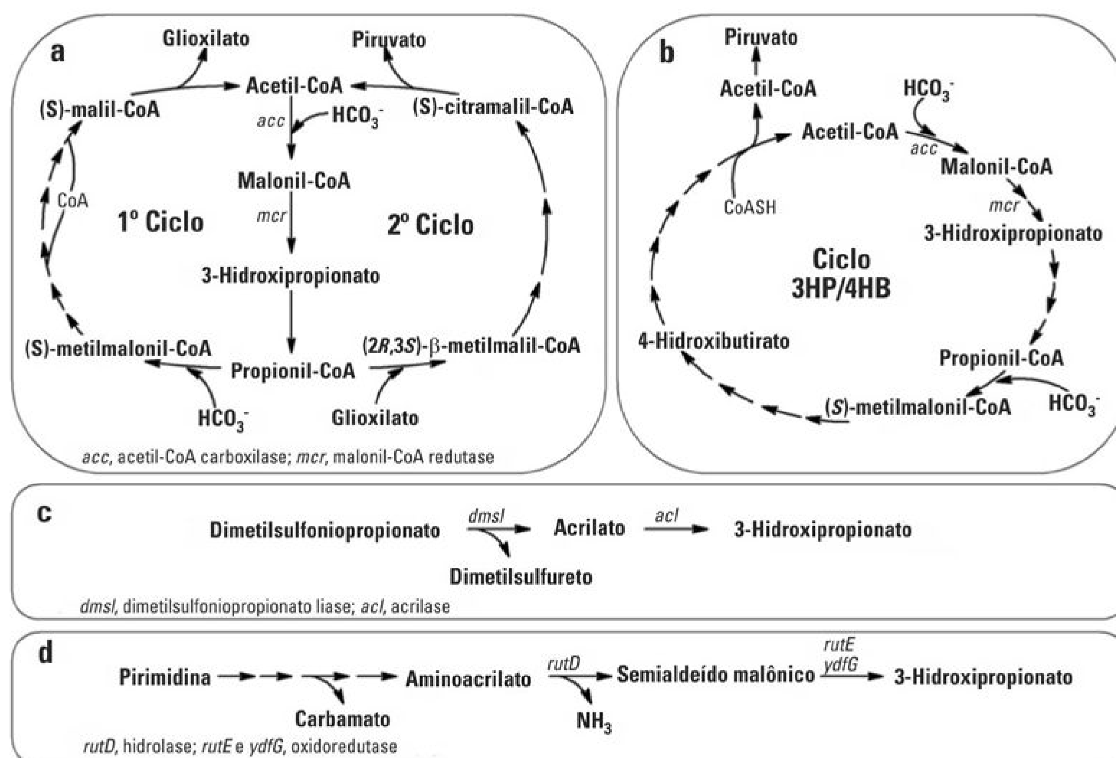


FIGURA 13.9 O ácido 3-hidroxipropiônico como produto intermédio em várias vias metabólicas em leveduras e bactérias. *C. aurantiacus* (a), *M. sedula* (b), *A. faecalis* (c), via de degradação pirimidina encontrada em leveduras e bactérias (d). *Fonte*: Adaptado de Valdehuesa *et al.* (2013).

No entanto, para a produção comercial de 3-HP, é desejável utilizar substratos baratos e abundantes, bem como adotar um processo de produção altamente eficiente que pode resultar em concentrações, rendimentos e produtividades elevadas, e nenhum dos micro-organismos naturais acima citados atende a esses critérios. Portanto, a construção de micro-organismos geneticamente modificados e sua aplicação no desenvolvimento de um processo biológico são essenciais para tornar o processo de produção de 3-HP por rota biológica comercialmente viável. Neste contexto, diferentes esquemas para produzir 3-HP a partir de glucose e glicerol têm sido sugeridos utilizando uma combinação de

biologia sintética, biologia de sistemas/computacional, engenharia evolutiva e engenharia metabólica (Kumar *et al.*, 2013; Valdehuesa *et al.*, 2013).

De fato, algumas vias biossintéticas já foram propostas para a produção de 3-HP a partir de piruvato (Figura 13.10) e uma dessas vias (piruvato → α-alanina → β-alanina → 3-oxopropanoato de etila → 3-HP) foi implementada em uma configuração industrial pela Cargill. No entanto, com a exceção da via implementada, todos os caminhos propostos, até agora, para a biossíntese de 3-HP envolvem o consumo de ATP. Isso reduz o rendimento em que 3-HP pode ser produzido a partir de matérias-primas, o que faz com que essas vias sejam menos viáveis economicamente (Henry *et al.*, 2010).

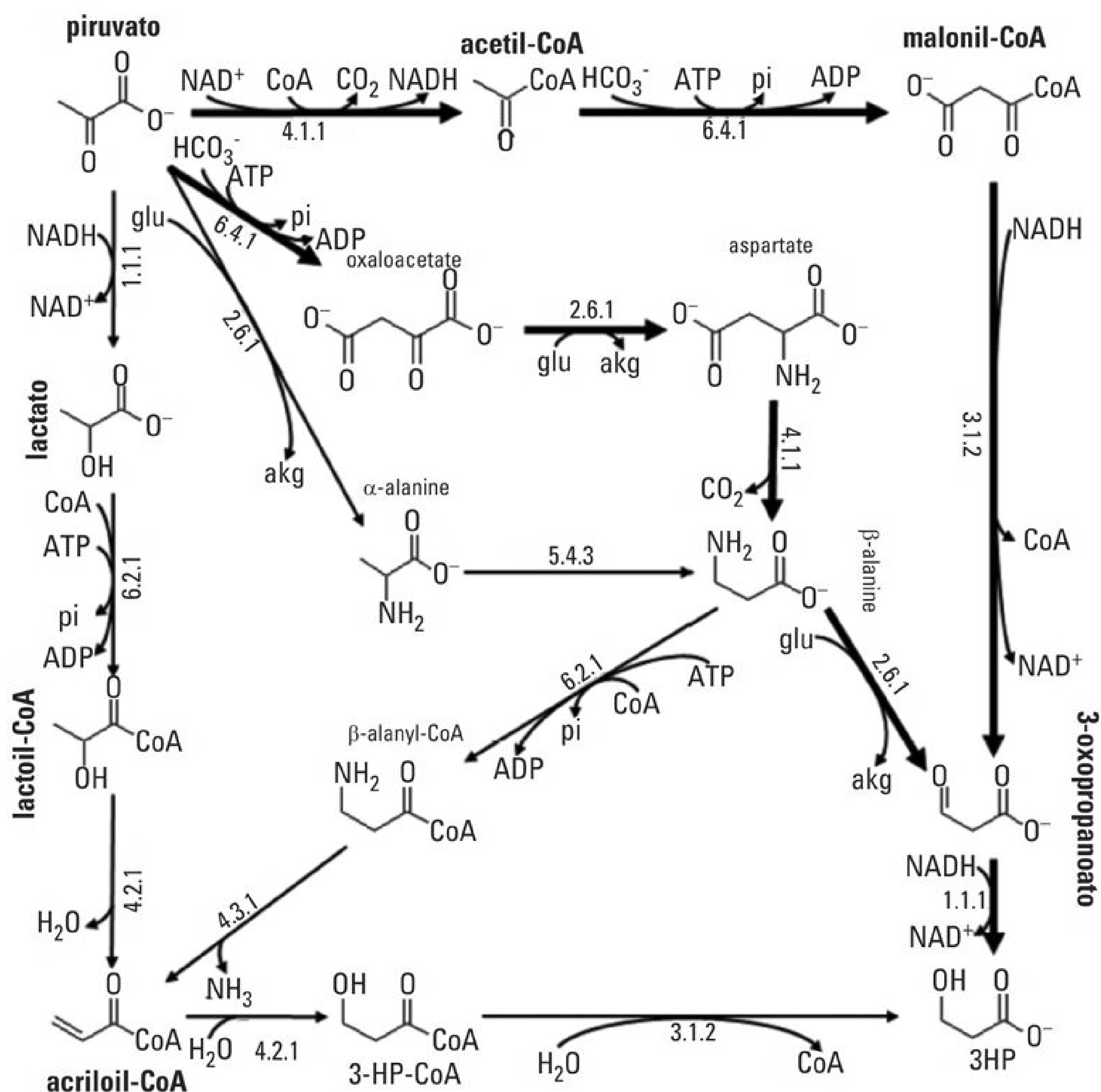


FIGURA 13.10 As vias conhecidas a partir do piruvato para obtenção de 3-HP. As vias mais termodinamicamente favoráveis são destacadas em negrito. *Fonte*: Adaptado de Henry *et al.* (2010).

Portanto, novas vias biossintéticas para a produção de 3-HP foram propostas baseando-se em métodos computacionais para ultrapassar essa problemática. Um desses métodos é a Rede Integrada Computacional de Bioquímica (BNICE, sigla em inglês), que gera todas as possíveis rotas bioquímicas de ligação entre um composto de partida e produto alvo com base em um conjunto de regras de reações enzimáticas. Henry *et al.* (2010) utilizaram BNICE para gerar uma variedade de vias para a produção de 3-HP a partir do piruvato. *E. coli* foi utilizada como micro-organismo modelo e o cultivo anaeróbico com glicose como a única fonte de carbono foi

assumido. O método propôs três novas vias que são igualmente tão boas como a via proposta pela Cargill. A via mais curta dessa nova proposta envolve apenas duas etapas (piruvato → lactato → 3-HP) e fornece o maior rendimento teórico de produção de 3-HP de 2,0 moles/mol glicose. Essa via tem uma nova reação, a condensação de lactato a 3-HP. A constante de equilíbrio desta reação é inferior a um (0,4) e a variação da energia livre de Gibbs padrão (ΔG°) é positiva, o que mostra que essa etapa é termodinamicamente desfavorável. Por isso, sugeriu-se manter uma elevada concentração de lactato intracelular e baixa concentração de 3-HP. A máxima concentração alcançável intracelular de 3-HP foi estimada em apenas 1,0 mM (Henry *et al.*, 2010).

Um substrato que vem sendo cogitado para a produção de 3-HP por ser um novo subproduto industrial é o glicerol. O glicerol é um substrato mais reduzido do que açúcares comuns e como consequência a conversão de glicerol em piruvato gera duas vezes mais equivalentes redutores que os açúcares. A produção de 3-HP por várias espécies de *Lactobacillus* (*L.* 208-A, *L. reuteri* e *L. collinoides*), *S. enteric* e *K. pneumoniae* depende de uma via CoA-dependente. *Resting cells* de cepas mutantes de *L. reuteri* sem glicerol desidrogenase produziram 7,2 g/L de PDO e 8,5 g/L de 3-HP a partir de glicerol (Kumar *et al.*, 2013).

O metabolismo de glicerol de *K. pneumoniae* consiste em dois ramos: o oxidativo, que é direcionado para conversão de intermediários metabólicos necessários para o crescimento celular e para a formação de outros metabolitos; e o ramo redutor, que se inicia com a desidratação de glicerol em 3-HPA (3-hidroxipropionaldeído), reação catalisada por glicerol desidratase (*dhaB*). Esta etapa requer a participação da coenzima B_{12}. O 3-HPA é ainda convertido em 1,3-PDO por uma desidrogenase dependente de NADH codificada pelo gene *dhaT*. Como o 3-HP não é um metabolito natural para *K. pneumoniae*, identificou-se uma aldeído-desidrogenase NAD+ dependente, eficiente na conversão 3-HPA a 3-HP, e seu gene foi superexpressado. A cepa de *K. pneumoniae* com esse gene superexpresso e com mutações no ramo oxidativo produziu 17 g/L de 1,3-PDO e 6,8 g/L de 3-HP. A maior produção de 3-HP por cepas mutantes de *K. pneumoniae* a partir de glicerol até o momento foi de 28 g/L (Valdehuesa *et al.*, 2013).

Uma via de produção de 3-HP com duas etapas foi construída em *E. coli* recombinante com os genes necessários. A primeira cepa capaz de produzir 3-HP a partir de glicerol foi construída através da colocação do gene *DhaB* de *K. pneumoniae* e *AldH* de *E. coli*. Esta cepa acumulou 0,58 g/L de 3-HP em condições aeróbias. Os parâmetros do processo, tais como pH,

concentração de indutor, aeração e concentração de substrato foram otimizadas usando esta cepa, o que resultou em uma concentração de 3-HP de 31 g/L. A desvantagem do uso de *E. coli* é que essa espécie não tem habilidade de produzir sua própria coenzima B_{12}, diferente de *K. penumoniae*. No entanto, colocando a via de produção da coenzima B_{12} em *E. coli* pode fazer esse micro-organismo mais competitivo para a produção de 3-HP (Valdehuesa *et al.*, 2013).

Atualmente, todas as vias metabólicas propostas para a produção 3-HP utilizam glicose ou glicerol como substratos. O único e maior relatado de produção de 3-HP a partir de glicose é utilizando *E. coli* modificada através da inserção de vários genes de enzimas-chave do ciclo de 3-HP encontrados em bactérias fixadoras de carbono. Outras manipulações de engenharia genética são necessárias para aumentar a concentração de 3-HP para se obter um nível aceitável para produção em escala industrial. A biossíntese de 3-HP utilizando glicerol como o substrato ainda está na etapa de otimização e suas maiores concentrações e rendimentos estão aproximando-se do nível de viabilidade industrial. Entre os dois micro-organismos-alvo *E. coli* tem maior potencial uma vez que é geralmente aceito para utilização industrial, ao contrário *K. pneumoniae*. Outros micro-organismos industriais também podem ser explorados utilizando esta via (Valdehuesa *et al.*, 2013).

13.3. Dióis

Dentre os dióis utilizados na síntese de polímeros destacam-se o 1,3-propanodiol, 2,3-butanodiol e 1,4-butanodiol.

13.3.1. 1,3-propanodiol

O 1,3-propandiol (1,3-PDO), também conhecido como trimetilenoglicol ou 1,3-di- -hidroxipropano, é um diol contendo três átomos de carbono em sua estrutura como mostra a Figura 13.11.

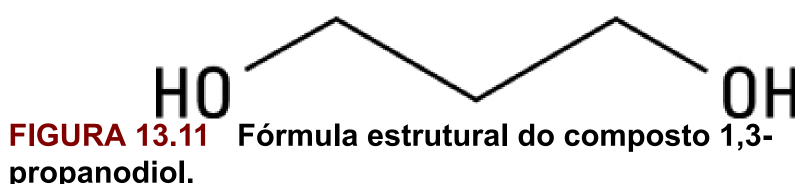


FIGURA 13.11 **Fórmula estrutural do composto 1,3-propanodiol.**

O 1,3-PDO é utilizado na produção de cosméticos, produtos de limpeza, como anticongelante, como fluido de transferência de calor, bem como base em soluções para refrigeração de motores que requerem estabilidade em ampla faixa de temperatura. Por ser uma molécula orgânica bifuncional, o 1,3-PDO é utilizado em reações de síntese, especialmente como monômero na produção de poliésteres e poliuretanos. Aplicações mais recentes envolvem ainda sua utilização na indústria de alimentos e no setor farmacêutico (DuPont Tate & Lyle BioProducts).

Uma das principais aplicações dessa molécula bifuncional é na produção do polímero polipropileno tereftalato (PPT), também denominado politrimetileno tereftalato (PTT) ou 3GT (glicol de 3 carbonos/tereftalato). O PPT apresenta melhor resiliência, maior facilidade de coloração e melhores propriedades elásticas quando comparado a outras resinas como o polietileno tereftalato (PET) e o polibutileno tereftalato (PBT). Além disso, o PPT é resistente à descoloração (lavagens sucessivas) e à estática, podendo ser utilizado em áreas tão distintas como carpetes, vestuário, têxtil, termoplástico de engenharia e monofilamentos (Silva *et al.*, 2014).

Existem três rotas comerciais para produção de 1,3-propanodiol: a hidratação de acroleína seguida por hidrogenação; a hidroformilação e hidrogenação do óxido de etileno; e um bioprocesso a partir de glicose. O

primeiro processo, utilizado pela DuPont, usa o método convencional de preparação partindo da acroleína, que é obtida por oxidação catalítica do propileno. A acroleína é hidratada a temperatura moderada e pressão até 3-hidroxipropionaldeído que, na segunda reação, é hidrogenado a 1,3-propanodiol por um catalisador de rubídio sob alta pressão (90 bar). O segundo processo, utilizado pela Shell, inicia-se com o óxido de etileno, obtido através da oxidação do etileno. O óxido de etileno é transformado juntamente com gás de síntese em 3-hidroxipropionaldeído através de um processo de hidroformilação, mas para esta reação é necessária elevada pressão (150 bar). O 3-hidroxipropionaldeído é extraído da fase orgânica com água e hidrogenado utilizando níquel como catalisador, novamente sob alta pressão (Zeng e Biebl, 2002).

No primeiro caso, o rendimento não excede 40% e no segundo caso, é de cerca de 80%. Os principais problemas envolvidos nestes processos convencionais são a elevada pressão aplicada na hidroformilação e hidrogenação, juntamente com a alta temperatura, o uso de catalisador de elevado custo e a liberação de intermediários tóxicos (Saxena *et al.*, 2009). Com isso, as rotas químicas foram desativadas e a rota industrial para produção de 1,3-propanodiol utilizada atualmente é uma rota biotecnológica.

O processo biotecnológico desenvolvido pela DuPont começou a operar em 2006 e consiste na produção de 1,3-PDO a partir de glicose de milho utilizando uma cepa de *Escherichia coli* modificada geneticamente. Esse novo processo não só produz 1,3-PDO a partir de matéria-prima renovável como também consome 40% menos energia que o processo inicialmente utilizado pela empresa DuPont que utilizava acroleína, um intermediário extremamente tóxico.

Os únicos micro-organismos naturalmente capazes de produzir 1,3-PDO pertencem ao grupo das bactérias, utilizando exclusivamente o glicerol como fonte de carbono. O gênero *Clostridium* e enterobactérias dos gêneros *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Citrobacter* são capazes de fermentar o glicerol produzindo 1,3- -PDO como principal produto sendo *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter freundii* e *Clostridium butyricum* as espécies mais estudadas (Ferreira, 2014).

As reações metabólicas envolvidas na fermentação do glicerol são diversas, mas, em princípio, a fermentação do glicerol pode ser dividida em duas vias: a redutora e a oxidativa. A via oxidativa é catalisada pelas enzimas glicerol desidrogenase, que converte glicerol em di-hidroxiacetona, e di-hidroxiacetona cinase, que fosforila este substrato a di-hidroxiacetona-fosfato, que é canalizado para a via glicolítica, gerando

ATP e equivalentes redutores ($NADH.H^+$). Na via redutora, o glicerol é desidratado a 3-hidroxipropionaldeído por ação da glicerol desidratase, que é, então, reduzido a 1,3-PDO pela 1,3-propanodiol oxirredutase com consumo de poder redutor ($NADH.H^+$) (Biebl *et al.*, 2001; Silva *et al.*, 2014). Sendo assim, o poder redutor gerado no metabolismo oxidativo do glicerol é regenerado durante a síntese de 1,3-PDO e nas reações da glicólise, resultando na formação de subprodutos como pode ser visto na Figura 13.12.

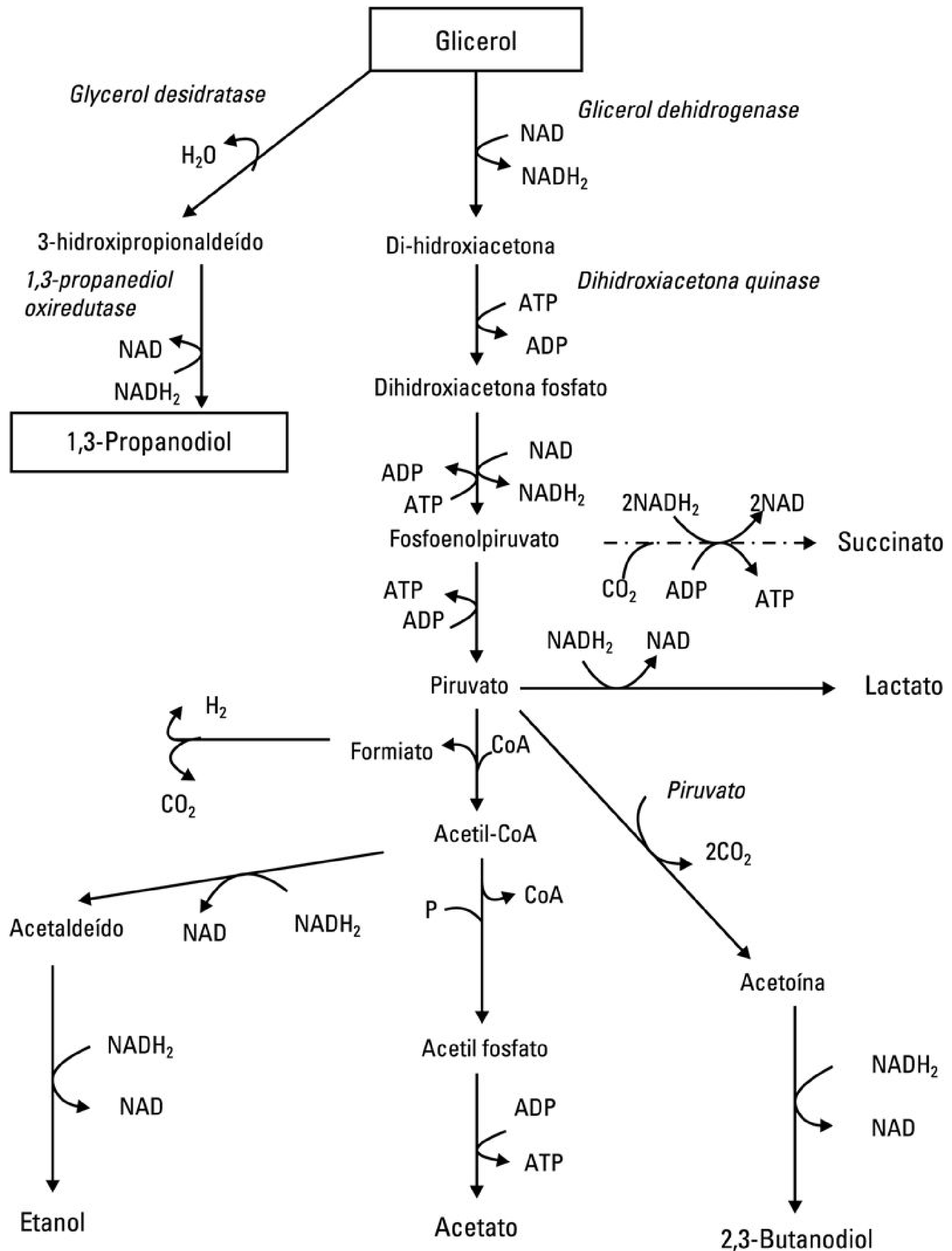


FIGURA 13.12 Vias bioquímicas de fermentação do glicerol por enterobactérias. *Fonte*: Ferreira (2014).

A Figura 13.12 mostra as vias bioquímicas de fermentação do glicerol para enterobactérias. No caso das bactérias da classe Clostridia, o subproduto 2,3-butanodiol é substituído por butanol e butirato (Biebl *et al.*, 1999).

O rendimento de 1,3-PDO depende da combinação e estequiometria das vias redutora e oxidativa. Tem sido demonstrado que a formação de 1,3-PDO com ácido acético como único subproduto da via oxidativa resulta no rendimento máximo de 1,3-PDO. Isso pode ser explicado pelo fato de o acetato ser o único subproduto que não utiliza poder redutor ($NADH.H^+$) para sua formação a partir do piruvato, gerando um saldo maior de $NADH.H^+$ para ser utilizado na conversão de 3-hidroxipropionaldeído em 1,3-propanodiol (Ferreira, 2014).

O rendimento teórico máximo está estimado em 0,67 mol de 1,3-PDO por mol de glicerol quando o único coproduto formado é o acetato. Se nenhum H_2 é produzido durante a fermentação, o rendimento teórico pode aumentar para 0,75 mol de 1,3-PDO por mol de glicerol. Contudo, na fermentação real outros coprodutos são formados, reduzindo o rendimento em 1,3-PDO. Em particular, o etanol e o butanol que não contribuem para o pool de $NADH_2$ (Tjahjasari *et al.,* 2011).

Outro fator extremamente relevante para o rendimento de 1,3-PDO é o pH do meio de cultivo. A influência do pH na produção de 1,3-PDO vem sendo estudada há bastante tempo. Gunzel *et al.* (1991) investigaram a influência da produção de 1,3-PDO a partir de glicerol por *Clostridium butyricum*. As bateladas foram realizadas em biorreator em 7 diferentes pHs (6,0; 6,6; 6,8; 7,0; 7,2; 7,4; 8,0). Os autores obtiveram os melhores resultados na faixa de 6,6-7,0, sendo que a produtividade foi igual para as três condições estudadas nessa faixa (2,2 $g.L^{-1}.h^{-1}$).

Biebl *et al.* (1998) verificaram que em condições de pH baixo, o fornecimento de elétrons para produção de 1,3-PDO pode ser totalmente direcionado para a síntese de 2,3-butanodiol. Os autores produziram 1,3-PDO a partir de glicerol utilizando *Klebsiella pneumonia* e observaram o maior rendimento de 1,3-PDO em pH = 7,0. Conforme esse pH vai sendo reduzido, diminui o rendimento em 1,3- -PDO, acetato e etanol, mas o rendimento em 2,3-BDO aumenta significativamente.

Ji *et al.* (2009) verificaram um maior rendimento em 2,3-BDO em pH 6,3 e um maior rendimento em ácido lático em pH 7,1. Com o objetivo de reduzir a formação de 2,3-BDO, que ocorre entre os pHs 5,0-6,5, e ácido láctico, que ocorre entre os pHs 7,1-8,0, Ji *et al.* (2009) investigaram o efeito da oscilação do pH (6,3-7,3) durante a fermentação de glicerol por *K. pneumoniae*. Os autores obtiveram a maior produção de 1,3-PDO (70 $g.L^{-1}$)

e a maior produtividade (0,97 $g.L^{-1}.h^{-1}$) quando o pH oscilou entre 6,3 e 7,3 a cada 16 horas. Esses resultados comprovam a grande importância do controle de pH na via fermentativa de glicerol, visto que este parâmetro influencia significativamente nos rendimentos dos produtos obtidos.

Uma questão importante em processos fermentativos é a inibição que o substrato e os produtos da fermentação exercem sobre os micro-organismos. No caso da produção de 1,3-PDO a partir de glicerol, essa inibição vem sendo bastante estudada (Barbirato *et al.*, 1996; Colin *et al.*, 2000; Cheng *et al.*, 2005). O responsável pela inibição parece ser o 3-hidroxipropionaldeído (3-HPA), que é um intermediário intracelular altamente tóxico (Figura 13.12). Portanto, em condições de elevada concentração de glicerol esse intermediário se acumula podendo ser excretado no meio. Barbirato *et al.* (1996) verificaram que *Enterobacter agglomerans* CNCM1210, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 25955 e *Citrobacter freundii* ATCC 8090 eram totalmente inibidas quando a concentração de 3-HPA atingia 2,2 $g.L^{-1}$, cessando, assim, o crescimento celular e o consumo de glicerol. A cepa *E. agglomerans* CNCM1210 foi crescida em quatro diferentes concentrações de glicerol (22,0; 34,0; 44,2 e 76,4 $g.L^{-1}$) e verificou-se o completo consumo de glicerol e a ausência de 3-HPA nas duas concentrações inferiores. Já nas concentrações superiores, o glicerol não foi totalmente consumido, nos dois experimentos a atividade microbiana foi totalmente inibida após o consumo de 39,5 $g.L^{-1}$ de glicerol. As cepas *K. pneumoniae* ATCC 25955 e *C. freundii* ATCC 8090 foram crescidas em duas diferentes concentrações de glicerol (22,0 e 68,0 $g.L^{-1}$) e verificou-se o completo consumo do glicerol nas duas condições, sendo que na concentração inferior não houve presença de 3-HPA no meio. Porém, na concentração superior o intermediário 3-HPA atingiu a concentração de 1,78 $g.L^{-1}$ e 1,26 $g.L^{-1}$ no meio para as cepas *K. pneumoniae* ATCC 25955 e *C. freundii* ATCC 8090, respectivamente. Contudo, em seguida este foi convertido em 1,3-PDO.

A inibição dos produtos da fermentação de 1,3-PDO por *Clostridium butyricum* DSM 5431 foi estudada por Biebl (1991). O autor verificou que concentrações de 60 $g.L^{-1}$ de 1,3-PDO, 27 $g.L^{-1}$ de ácido acético e 19 $g.L^{-1}$ de ácido butírico são suficientes para causar inibição total do crescimento microbiano em pH 6,5. O autor verificou também inibição por glicerol em concentrações maiores que 80 $g.L^{-1}$. Resultados semelhantes foram obtidos por Zeng *et al.* (1994).

A produção de 1,3-PDO se enquadra no conceito de biorrefinaria visto que pode se dar por rota biotecnológica a partir de um resíduo da produção de biodiesel, a glicerina. Com o aumento da produção de

biodiesel nas últimas décadas, a glicerina se tornou um resíduo disponível em grandes quantidades. Portanto, um dos desafios da utilização da glicerina como fonte de carbono para a produção de 1,3-PDO por rota biotecnológica consiste na seleção de cepas tolerantes às impurezas presentes nesse resíduo (sais, ácidos graxos livres, metanol etc.).

13.3.2. 2,3-butanodiol

O 2,3-butanodiol (2,3-BDO), também conhecido como 2,3-butilenoglicol, 2,3-di- -hidroxibutano ou dimetilenoglicol, é um diol contendo quatro átomos de carbono em sua estrutura. Três formas estereoisoméricas do 2,3-BDO podem ser obtidas como mostra a Figura 13.13, duas formas opticamente ativas (dextro e levo) e uma forma opticamente inativa (meso).

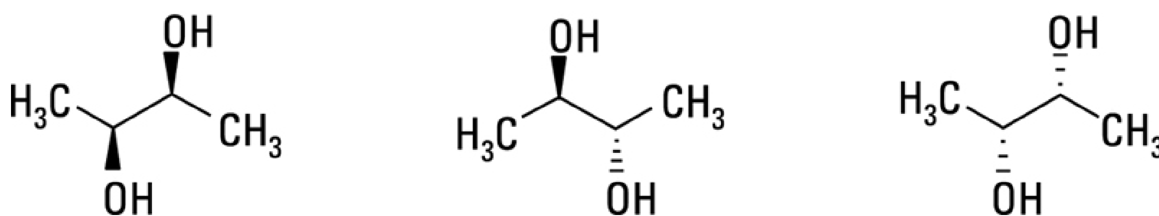


FIGURA 13.13 **Isômeros do composto 2,3-butanodiol: (a) *L*-(+)-2,3-butanodiol (dextrogiro); (b) meso-2,3-butanodiol (opticamente inativo); (c) D-(-)-2,3-butanodiol (levogiro).**

O 2,3-BDO é utilizado na produção de agentes umectantes, perfumes, explosivos, tintas de impressão, plásticos (nitrato de celulose, poli (cloreto de vinila), poliacrilatos), alimentos e fármacos. Uma das suas principais aplicações consiste na utilização para produção de 1,3-butadieno, um importante intermediário da borracha sintética (Celinska e Grajek, 2009; Ji *et al*., 2011).

Muitos micro-organismos são capazes de produzir 2,3-BDO em quantidades significativas, porém as bactérias do gênero *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Bacillus* and *Serratia* apresentam importância industrial devido aos elevados rendimentos obtidos. O isômero do 2,3-BDO formado depende do micro-organismo utilizado, mas normalmente uma mistura de dois estereoisômeros é produzida.

K. pneumoniae, *K. oxytoca* e *B. polymyxa* encontram-se entre os micro-organismos promissores para produção industrial de 2,3-BDO. *Klebsiella* sp normalmente produz duas vezes mais 2,3-BDO quando comparada a *B. polymyxa*. *Klebsiella* sp também tem a vantagem de ser facilmente cultivada,

cresce em meio simples e é capaz de metabolizar uma gama de açúcares (glicose, manose, galactose, xilose, arabionose, celobiose e lactose). Contudo, a patogenicidade apresentada pelas cepas de *Klebsiella* se torna um obstáculo para a produção de 2,3-BDO em larga escala. Além disso, *Klebsiella* sp e *Enterobacter* sp produzem uma mistura de levo e meso estereoisômeros de 2,3-BDO. Já *B. polymyxa* tem habilidade de produzir o estereoisômero levo puro, muito interessante devido ao seu potencial como anticongelante. Outra vantagem apresentada pela *B. polymyxa* consiste na sua capacidade de fermentar xilana, inulina e amido.

Uma variedade de monossacarídeos (hexoses e pentoses) pode ser convertida em 2,3-BDO, como, por exemplo, manose, ribose, arabinose, xylose, lactose, galactose, glicose e frutose. No metabolismo bacteriano, primeiramente o monossacarídeo é transformado em piruvato através da via glicolítica, no caso das hexoses, ou através do ciclo das pentoses, no caso das pentoses. Em seguida, as etapas são iguais às apresentadas na Figura 13.12, ou seja, o piruvato é convertido em acetato, lactato, formiato, succinato, etanol, acetoína e 2,3-BDO (Celinska e Grajek, 2009; Ji *et al.*, 2011).

O glicerol também pode ser uma fonte de carbono para produção microbiana de 2,3-BDO. Porém, como já citado anteriormente, o principal produto da fermentação de glicerol é o 1,3-PDO. Contudo, em condições de baixo pH e microaerofilia o rendimento em 1,3-PDO é reduzido e o 2,3-BDO é preferencialmente formado.

A literatura reporta a utilização de celulose e hemicelulose na obtenção microbiana de 2,3-BDO. Muitos estudos têm focado na fermentação de açúcares provenientes de hidrolisados de madeira utilizando *B. polymyxa* e *K. oxytoca*. No entanto, *K. oxytoca* não produz celulases e hemicelulases, sendo necessário um pré-tratamento do substrato. Infelizmente, alguns desses pré-tratamentos liberam derivados tóxicos no meio de cultivo como furfural e derivados da lignina (Syu, 2001; Celinska e Grajek, 2009).

Sendo assim, dentro da concepção de biorrefinaria, uma grande variedade de biomassa pode ser utilizada para produção de 2,3-BDO visando a redução dos custos da fermentação. Dentre elas, destacam-se: o resíduo da indústria de alimentos (hidrolisado de amido proveniente do processamento do milho, melaço proveniente da extração de açúcar, soro da fabricação de leite), devido seu alto teor de açúcares e compatibilidade com os bioprocessos; glicerina proveniente da produção de biodiesel; espiga de milho e madeira, porém ambos necessitam de tratamento prévio para hidrolisar a celulose e hemicelulose (Ji *et al.*, 2011).

A produção microbiana de 2,3-BDO depende de alguns parâmetros importantes que serão discutidos neste capítulo. O parâmetro mais relevante para tal bioprocesso é a taxa de transferência de oxigênio visto que os principais micro-organismos estudados, *Klebsiella* sp e *B. polymyxa*, são anaeróbios facultativos. Sendo assim, estas bactérias obtêm energia através de duas vias diferentes: respiração e fermentação.

Quando a disponibilidade de O_2 é limitada, as duas vias são ativadas simultaneamente. O rendimento de 2,3-BDO depende do balanço entre essas duas vias. Uma redução do O_2 disponível causa um aumento no rendimento de 2,3-BDO porque limita a respiração, porém a baixa disponibilidade de O_2 limita a produção de biomassa e consequentemente diminui o rendimento de 2,3-BDO (Celinska e Grajek, 2009).

A proporção dos metabólitos produzidos pode ser controlada através da relação entre a oferta e a demanda de O_2. Em geral, uma elevada oferta de O_2 favorece a formação de biomassa e CO_2. O desvio do metabolismo da produção de biomassa para a produção de ácidos e 2,3-BDO ocorre devido à necessidade de se manter o balanço redox. Sob condições de aerobiose, o NADH formado na glicólise é regenerado na respiração. Sob condições anaeróbias, como não ocorre a respiração, a formação de 2,3-BDO e outros metabólitos tem o mesmo propósito, regenerar o NADH, como mostra a Figura 13.12.

A Figura 13.14 mostra o rendimento de cada metabólito em relação à disponibilidade relativa de oxigênio no meio de cultivo. Na ausência de O_2, normalmente o etanol é formado em proporção equimolar ao 2,3-BDO, portanto, formiato, acetato, lactato e acetoína também são produzidos. Mantendo a disponibilidade de O_2 inferior ao seu consumo, a formação de etanol e formiato é evitada e a glicose é totalmente direcionada para produção de 2,3-BDO. Aumentando a disponibilidade de O_2 para valores próximos ao consumo, ocorre um aumento da relação acetoína:2,3-BDO. O aumento da disponibilidade de O_2 para valores um pouco superiores à necessidade de consumo resulta na produção de ácido acético. Contudo, se a oferta de O_2 é muito superior ao seu consumo, os únicos produtos formados serão biomassa e CO_2 (Syu, 2001; Celinska e Grajek, 2009).

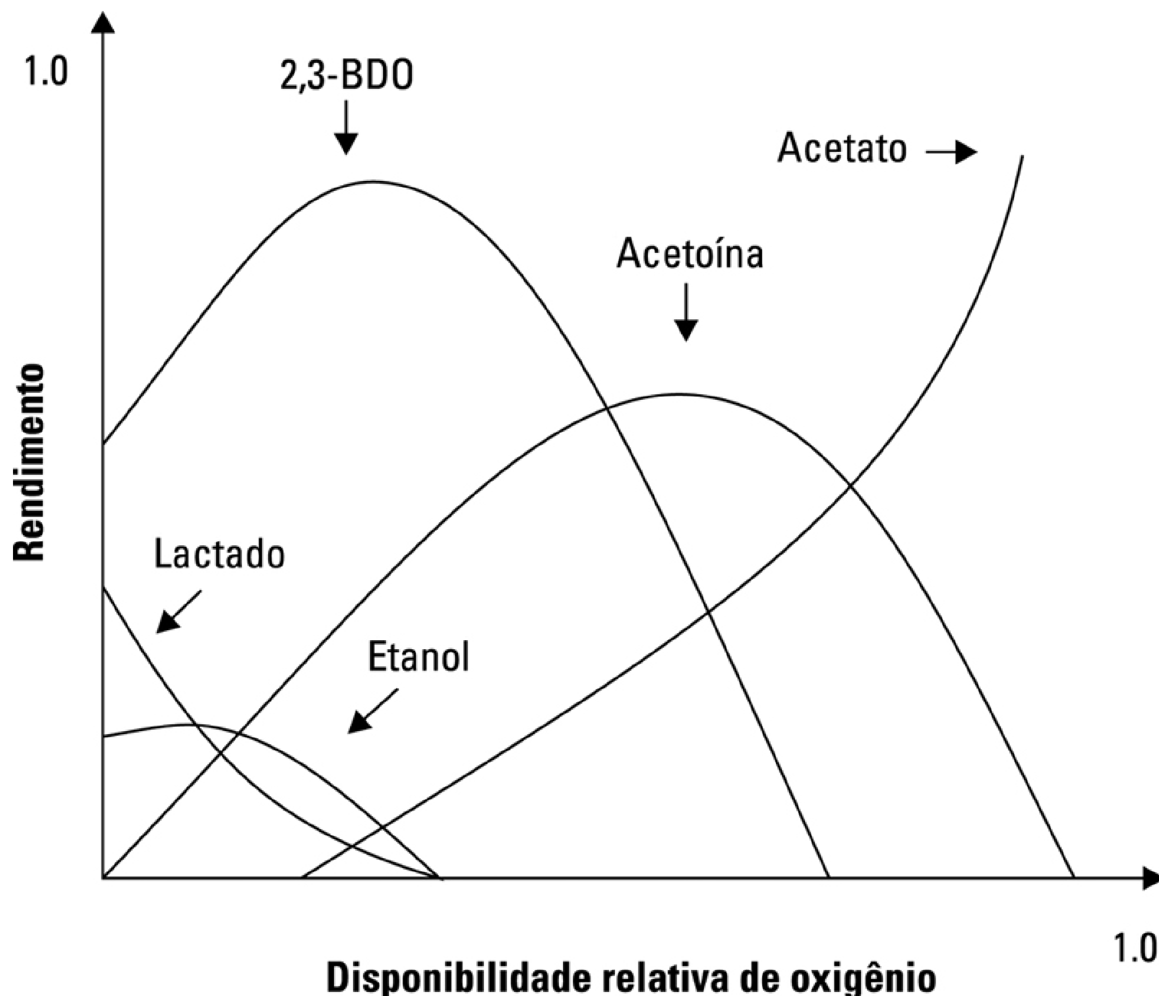


FIGURA 13.14 Efeito da disponibilidade relativa de oxigênio no rendimento fracionado dos metabólitos obtidos por *B. polymyxa*. *Fonte*: Adaptado de Celinska e Grajek (2009).

Outro parâmetro bastante importante na biossíntese de 2,3-BDO, é o pH. Em condições alcalinas, a formação de ácidos orgânicos é favorecida com simultânea redução no rendimento de 2,3-BDO. Em condições ácidas, a síntese dos ácidos orgânicos é reduzida e a síntese de diol aumenta significativamente. Contudo, o pH ótimo para a formação do 2,3-BDO depende fortemente do micro-organismo e do substrato utilizados (Celinska e Grajek, 2009).

A temperatura também influencia na biossíntese de 2,3-BDO, visto que a atividade das enzimas envolvidas nos bioprocessos depende da temperatura. A temperatura ótima de produção de 2,3-BDO depende do micro-organismo utilizado e muitas vezes é diferente da temperatura ótima de crescimento do micro-organismo.

A concentração inicial do substrato é um fator determinante para a produção de 2,3-BDO. Quando se utiliza um meio sintético suplementado com um açúcar puro, como no caso a glicose, não há atividade inibitória da síntese do diol, sendo possível fermentar meios com a concentração inicial de açúcar acima de 200 $g.L^{-1}$. Um aumento na concentração inicial de açúcar geralmente resulta num aumento do rendimento em 2,3-BDO. Contudo, observou-se que em concentrações de açúcar abaixo de 20 $g.L^{-1}$ ocorre uma redução na taxa específica de crescimento, o que possivelmente é resultado de uma queda na atividade de água. As maiores produtividades de 2,3-BDO são obtidas quando a concentração inicial de açúcar é aproximadamente 100 $g.L^{-1}$ (Celinska e Grajek, 2009).

No entanto, numa biorrefinaria onde se utilizam resíduos como substrato, a inibição é algo importante a ser considerado, pois os substratos utilizados possuem substâncias inibidoras sulfato, furfural, compostos fenólicos, entre outros. Sendo assim, grande parte desses resíduos precisa ser diluída no meio de cultivo.

A literatura reporta ainda que a adição de acetato ao meio de cultivo aumenta a eficiência da conversão do substrato em 2,3-BDO (Yu e Saddler, 1982; Nakashimada *et al.*, 2000). Bryn *et al.* (1973) reportaram que o acetato tem muitos efeitos na via de obtenção do 2,3-BDO. É capaz de induzir α-acetolactato sintase, α-acetalactato descarboxilase e diacetil redutase, mas também regula o balanço entre acetoína e 2,3-BDO. Neste estudo verificou-se que a butanodiol desidrogenase é induzida pela presença do acetato, mas na reação inversa, oxidação de 2,3-BDO a acetoína, o acetato age como um inibidor. Contudo, a inibição aumenta com o decréscimo do pH. Sendo assim, o ácido acético parece ser o responsável por tal efeito e não o acetato.

13.3.3. 1,4-butanodiol

O 1,4-butanodiol (1,4-BDO) é diol com quatro átomos de carbono em sua estrutura e uma hidroxila em cada extremidade da cadeia como mostra a Figura 13.15.

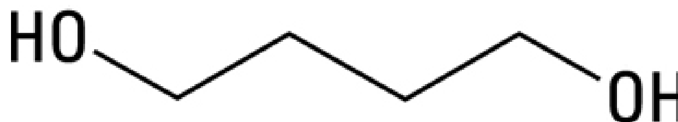


FIGURA 13.15 **Fórmula estrutural do composto 1,4-butanodiol.**

O 1,4-BDO é um diol comercializado em grandes quantidades no mercado global pois é utilizado para produção de plásticos automotivos, fibras para vestuário, poliéster, tênis, bolas de futebol e ainda produtos farmacêuticos (Burgard *et al.*, 2016; Yim *et al.*, 2011; Liu e Lu, 2015).

Atualmente, o 1,4-BDO é produzido a partir de matérias-primas fósseis através de quatro diferentes rotas químicas que demandam bastante energia e são responsáveis por emissões significativas de gases de efeito estufa (Burgard *et al.*, 2016; Haas *et al.*, 2005). Contudo, a produção de 1,4-BDO por rota biotecnológica está sendo bastante estudada, sendo que esta rota é um pouco mais complexa do que as rotas apresentadas anteriormente para os demais dióis relatados neste capítulo, visto que o 1,4-BDO não é produzido naturalmente por nenhum micro-organismo conhecido. Assim, é necessário utilizar a ferramenta de engenharia genética para que se torne possível a produção biotecnológica desse diol de interesse.

Os substratos utilizados para produção de 1,4-BDO são os açúcares como a glicose, xylose, L-arabinose, sacarose, sendo que a maior parte dos trabalhos publicados propõe a utilização de açúcares derivados de material lignocelulósico como fonte de carbono para a fermentação. Em todos os trabalhos publicados, o micro-organismo utilizado é uma cepa de *Escherichia coli* modificada geneticamente (Burgard *et al.*, 2016; Tai *et al.*, 2016; Liu e Lu, 2015; Yim *et al.*, 2011). Para escolher as melhores estratégias de manipulação genética e otimizar a produção do diol em questão utiliza-se ferramentas como a biologia sintética, biologia de sistemas/computacional e engenharia metabólica.

Burgard *et al.* (2016) construíram uma cepa capaz de converter glicose, sacarose e açúcares de biomassa celulósica (C_5 + C_6) em 1,4-BDO. A estratégia se baseou na inserção de cinco etapas capazes de converter o succinil-CoA, intermediário do ciclo de Krebs, em 1,4-BDO. Os genes responsáveis por cada etapa foram identificados via análise por bioinformática das enzimas conhecidas por realizarem transformações análogas. Centenas de enzimas foram analisadas *in vitro* e *in vivo*. As etapas inseridas na cepa de *E. coli* encontram-se representadas na Figura 13.16.

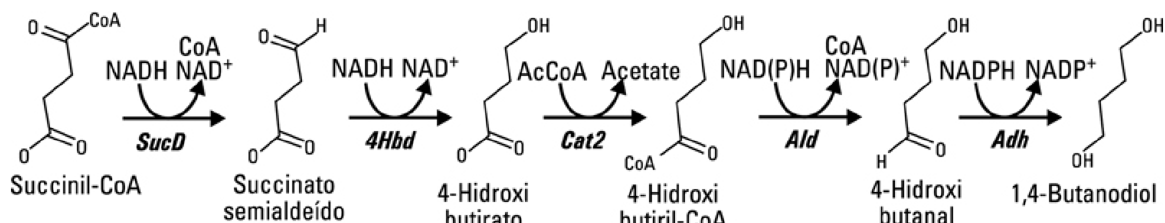


FIGURA 13.16 Biossíntese de 1,4-BDO a partir do intermediário do ciclo de Krebs, o succinil-CoA. SucD (Succinato semialdeído desidrogenase dependente de CoA); 4Hbd (4-Hidroxibutirato desidrogenase); Cat2 (Acil-CoA transferase); Ald (aldeído desidrogenase); Adh (álcool desidrogenase). *Fonte*: Adaptado de Burgard *et al.* (2016).

Devido à via de síntese de 1,4-BDO conter uma série de etapas de redução e requerer energia, é importante a interação do metabolismo central com o balanço redox e o balanço de ATP. Incialmente, Burgard *et al.* (2016) realizaram uma série de modificações genéticas visando direcionar o fluxo para o ciclo de Krebs sob condições de baixa oxigenação (microaerofilia). Além disso, aumentou o rendimento de 1,4-BDO reduzindo a competição da via de produção deste diol com o ciclo de Krebs. Por fim, modificações genéticas visando a minimização dos subprodutos como acetato, etanol, glutamato e 4-aminobutirato também contribuíram para o aumento da produção de 1,4-BDO.

Yim *et al.* (2011) prepararam *E. coli* para produção de 1,4-BDO a partir de glicose, xilose, sacarose e mistura de açúcares derivados de biomassa. Uma das rotas propostas parte da glicose e envolve a transformação do intermediário do ciclo de Krebs, o succinato, ativado como succinil-CoA em E. coli selvagens através da enzima succinil-CoA sintetase. Depois de duas etapas de redução catalisadas por succinato semialdeído desidrogenase dependente de CoA (SucD) e 4-hidroxibutirato desidrogenase (4Hbd), respectivamente, o succinil-CoA é convertido em 4-hidroxibutirato. SucD não é uma enzima existente em cepas selvagens de *E. coli*, porém sua atividade tem sido reportada em outras bactérias. A transformação de 4-hidroxibutirato em 1,4-BDO requer duas etapas de redução catalisada por desidrogenases. Álcool e aldeído desidrogenases são enzimas dependentes de NADH e/ou NADPH que são capazes de reduzir o grupamento carboxílico para um grupamento álcool. A rota descrita encontra-se na Figura 13.17. As etapas 2 e 7 ocorrem naturalmente em *E. coli*, as demais foram introduzidas por genes heterólogos.

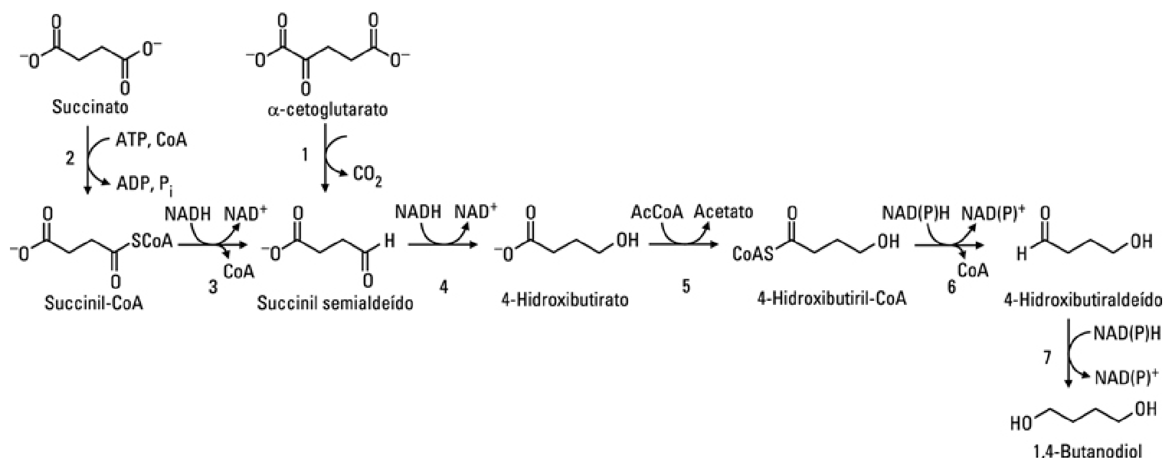


FIGURA 13.17 Biossíntese de 1,4-BDO a partir do intermediário do ciclo de Krebs, o succinato. Enzimas envolvidas na via: (1) 2-oxoglutarato descarboxilase, (2) succinil-CoA sintetase, (3) succinato semialdeído desidrogenase dependente de CoA, (4) 4-hidroxibutirato desidrogenase, (5) 4-hidroxibutiril-CoA transferase, (6) 4-hidroxibutiril-CoA redutase, (7) álcool desidrogenase.

Os autores ainda inseriram um *operon* contendo enzimas responsáveis pela metabolização da sacarose. Além da glicose e sacarose, a xilose e uma mistura de açúcares derivados de biomassa foram oferecidas como substrato à cepa construída. Os resultados indicaram eficiência aproximadamente igual de produção de 1,4-BDO a partir de todos esses substratos. Contudo, a concentração de 1,4-BDO a partir de xilose e da mistura de açúcares foi menor do que a partir de glicose. As densidades celulares também foram menores, o que resulta em concentrações mais baixas de todos os produtos.

Revisão dos conceitos apresentados

A humanidade vive um momento de preocupação com o meio ambiente que engloba a busca por energias renováveis, processos mais limpos, etc. Dentro deste contexto, surgiu o conceito de biorrefinaria. A biorrefinaria é um ambiente onde ocorre transformação de biomassa em uma variedade de produtos e energia através de rota química ou biotecnológica com a mínima geração de resíduos e emissões. Esses produtos são inúmeros e abrangem todas as categorias de produtos químicos: *commodities,* intermediários químicos e especialidades químicas. Neste capítulo destacou-se algumas moléculas funcionais como ácidos orgânicos e dióis que podem ser produzidos por rota biotecnológica a partir de biomassa, ou seja, moléculas intermediárias

que se enquadram no conceito de biorrefinaria. Dentre os ácidos orgânicos produzidos por micro-organismos encontram-se o ácido láctico, o ácido succínico e o ácido 3-hidroxipropiônico. Dentre os dióis, também conhecidos como glicóis, destacam-se o 1,3-propanodiol, o 2,3-butanodiol e o 1,4-butanodiol. Todas essas moléculas citadas apresentam importância significativa na indústria petroquímica visto que são utilizadas nas sínteses de polímeros com demanda crescente no mercado global.

Questões

1. Nos processos de conversão de biomassa, o custo com o substrato é um fator de grande importância, pois afeta significativamente o preço do produto. Dê exemplos de biomassa de baixo custo que podem ser utilizadas para biossíntese do ácido láctico, do ácido succínico e do ácido 3-hidroxipropiônico.
2. Visando a produção de 1,3-propanodiol a partir de glicerina, estudou-se duas rotas diferentes: a primeira utilizando *Klebsiella penumoniae*, onde obteve-se como produtos o 1,3-propanodiol e o 2,3-butanodiol; e a outra utilizando *Clostridium butyricum*, onde obteve-se como produtos o 1,3-propanodiol e o acetato. Em qual das duas rotas espera-se obter o maior rendimento em 1,3-propanodiol? Justifique.
3. A biomassa utilizada em uma biorrefinaria depende principalmente da sua disponibilidade. Sendo assim, um intermediário químico pode ser produzido a partir de substratos distintos em diferentes países. Proponha um substrato rico em carboidratos como sacarose, frutose e glicose e abundante no Brasil para a produção de 2,3-butanodiol por *K. penumoniae*.

Tópicos para discussão

1. Discuta sobre o conceito de biorrefinaria.
2. Discuta as diferenças entre uma biorrefinaria e um complexo integrado refino-petroquímica.
3. Discuta sobre as principais barreiras existentes na implantação de biorrefinarias.

Sugestões para pesquisa

1. Algumas das moléculas intermediárias estudadas neste capítulo são produzidas industrialmente por rota biotecnológica. Pesquise quais empresas são responsáveis por essas tecnologias.
2. Pesquise na literatura processos de produção de succinato a partir de matérias- -primas lignocelulósicas.
3. Busque alguns produtos que utilizam PLA em sua composição em substituição de plásticos convencionais.

Referências

Abdel-Rahman MA, Tashiro Y, Sonomoto K. Recent advances in lactic acid production by microbial fermentation processes. *Biotechnology Advances*. 2013;31:877–902.

Barbirato F, Grivet JP, Soucaille P, e Bories A. 3-Hydroxypropionaldehyde, an inhibitory metabolite of glycerol fermentation to 1,3-propanediol by Enterobacterial species. *Applied and Environmental Microbiology*. 1996;62:1448–1451.

Biebl H. Glycerol fermentation of 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. Measurement of product inhibition by use of a pH-auxostat. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1991;35(6):701–705.

Biebl H. Fermentation of glycerol by *Clostridium pasteurianum* batch and continuous culture studies. *Journal of Microbiology & Biotecnhology*. 2001;27:18–26.

Biebl H, Zeng A-P, Menzel K, Deckwer WD. Fermentation of glycerol to 1,3-propanediol and 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae*. *Appl Microbiol Biotechnol*. 1998;50:24–29.

Borges, E.B. 2011. Desenvolvimento de um processo para produção de ácido succínico por *Actinobacillus Succinogenes*. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Bryn K, Ulstrup JC, Stormer FC. Effect on acetate upon the fomation of acetoin in *Klebsiella* and *Enterobacter* and its possible practical apllication in a rapid Voges-Proskauer test. *Appl Microbiol*. 1973;25:511–512.

Burgard A, Burk MJ, Osterhout R, Van Dien S, Yim H. Development of a comercial scale process for prodution of 1,4-butanediol from sugar. *Current Opinion in Biotechnology*. 2016;42:118–125.

Celinska E, Grajek W. Biotechnology production of 2,3-butanediol – Current state and prospects. *Biotechnology Advances*. 2009;27:715–725.

Cheng K-K, Liu H-J, Liu D-H. Multiple growth inhibition of *Klebsiella pneumoniae* in 1,3-propanediol fermentation. *Biotechnology Letters*. 2005;27(1):19–22.

Cheng KK, Zhao XB, Zeng J, Zhang JA. Biotechnological production of succinic acid: current state and perspectives. *Biofuels Bioprod Bioref*. 2012;6:302–318.

Colin T, Bories A, Moulin G. Inhibition of *Clostridium butyricum* by 1,3-propanediol and diols during glycerol fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2000;54:201–205.

Drumright RE, Gruber PR, Henton DE. Polylactic acid technology. *Advanced materials*. 2000;12.23:1841–1846.

DuPont Tate & Lyle BioProducts. Disponível em: http://www.duponttateandlyle.com/. Acesso em 5 de maio de 2016.

Fernando S, Adhikari S, Chandrapal C, Murali N. Biorefineries: Current Status, Challenges, and Future Direction. *Energy & Fuels*. 2006;20:1727–1737.

Ferreira, T.F. 2014. Biossíntese de 1,3-propanodiol a partir de glicerina. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Gao C, Ma C, Xu P. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. *Biotechnology Advances*. 2011;29:930–939.

Haas T, Jaeger B, Weber R, Mitchell SF, King CF. New diol processes: 1,3-propanediol and 1,4-butanediol. *Applied Catalysis A: General*. 2005;280:83–88.

Henry CS, Broadbelt LJ, Hatzimanikatis V. Discovery and analysis of novel metabolic pathways for the biosynthesis of industrial chemicals: 3-hydroxypropanoate. *Biotechnology and bioengineering*. 2010;106.3:462–473.

Jansen MLA, Gulik WM. Towards large scale fermentative production of succinic acid. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014;30:190–197.

Ji XJ, Huang H, Ouyang PK. Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnology Advances*. 2011;29:351–364.

Ji XJ, Huang H, Zhu JG, Hu N. Efficient 1,3-propanediol production by fed-batch culture of *Klebsiella pneumoniae*: the role of pH fluctuation. *Appl Biochem Biotechnol*. 2009;159:605–613.

Kamm B, Kamm M. Principles of biorefineries. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004;64:137–145.

Kumar V, Ashok S, Park S. Recent advances in biological production of 3-hydroxypropionic acid. *Biotechnol Adv*. 2013;31(6):945–961.

Lee SY, Hong SH, Lee SH, Park SJ. Fermentative production of chemicals that can be used for polymer synthesis. *Macromol Biosci*. 2004;4:157–164.

Lipinsky ES, Sinclair RG. Is lactic acid a commodity chemical? *Chem Eng Prog*. 1986;82:26–32.

Liu H, Lu T. Autonomous production of 1,4-butanediol via a de novo biosynthesis pathway in engineered *Escherichia coli*. *Metabolic Engeneering*. 2015;29:135–141.

Martinez FAC, Balciunas EM, Salgado JM, Gonzalez JMD, Converti A, Oliveira RPS. Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2013;30:70–83.

Nakashimada Y, Marwoto B, Kashiwamura T, Kakizono T, Nishio N. Enhanced 2,3-butanediol production by addition of acetic acid in *Paenibacillus polymyxa*. *Biosci Bioeng*. 2000;90:661–664.

Pereira Jr., N. 2006. Biotecnologia de materiais lignocelulósicos para produção química. EQ/UFRJ, Prêmio Abiquim de Tecnologia.

Pina CD, Falletta E, Rossi M. A green approach to chemical building blocks. The case of 3-hydroxypropanoic acid. *Green Chem*. 2013;13:1624–1632.

Drumright RE, Gruber PR, Henton DE. Polylactic Acid Technology. *Adv Mater*. 2000;12(23):1841–1846.

Salvachúa. D, Mohaghegh A, Smith H, Bradfield MFA, Nicol W, Black BA, Biddy MJ, Dowe N, Beckham GT. Succinic acid production on xylose-enriched biorefinery streams by *Actinobacillus succinogenes* in batch fermentation. *Biotechnol Biofuels*. 2016;9(28).

Santos, M.F.R.F. 2011. Elaboração do *Technology Roadmap* para biorrefinaria de produtos da lignina no Brasil. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Escola de Química, Universidade Federal do Rio de Janeiro.

Saxena RK, Anand P, Saran S, Isar J. Microbial production of 1,3-propanediol: Recent developments and emerging opportunities. *Biotechnology Advances*. 2009;27:895–913.

Silva GP, Contiero J, Neto PMA, Lima CJB. 1,3-Propanodiol: Produção, Aplicações e Potencial Biotecnológico. *Quim Nova*. 2014;37(3):527–534.

Song H, Lee SY. Production of succinic acid by bacterial fermentation. *Enzyme and Microbial Technology*. 2006;39:352–361.

Syu MJ. Biological production of 2,3-butanediol. *Appl Microbiol Biotecnhol*. 2001;55:10–18.

Tai YS, Xiong M, Jambunathan P, Wang J, Wang J, Stapleton C, Zhang K. Engineering nonphosphorylative metabolism to generate lignocellulose-derived products. *Nature Chemical Biology*. 2016;12:247–253.

Tjahjasari D, Kaeding T, Zeng AP. 1,3-Propanediol and polytrimethyleneterephthalate. In: Moreina, Bai, eds. *Comprehensive Biotechnology*; 20113229–242.

Valdehuesa KNG, Liu H, Nisola GM, Chung WJ, Lee SH, Park SJ. Recent advances in the metabolic engineering of microorganisms for the production of 3- hydroxypropionic acid as C3 platform chemical. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2013;97:3309–3321.

Wang L, Zhao B, Li F, Xu K, Ma C, Tao F, Li Q, Xu P. Highly efficient production of D-lactate by *Sporolactobacillus* sp. CASD with simultaneous enzymatic hydrolysis of peanut meal. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2011;89:1009–1017.

Yim H, et al. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for direct production of 1,4-butanediol. *Nature Chemical Biology*. 2011;7:445–452.

Yu EK, Saddler JN. Enhanced production of 2,3-butanediol by *Klebsiella pneumoniae* grown on high sugar concentrations in the presence of acetic acid. *Appl Environ Microbiol*. 1982;44:777–784.

Yu L, Lei T, Ren X, Pei X, Feng Y. Response surface optimization of L-(+)-lactic acid production using corn steep liquor as an alternative nitrogen source by *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466. *Biochem Eng J*. 2008;39:496–502.

Zeng AP, Biebl H. Bulk chemicals from biotechnology: the case of 1,3-propanediol production and the new trends. *Advances in Biochemical Engineering Biotechnology*. 2002;74:239–259.

Zeng AP, Ross A, Biebl H, Tag C, Gunzel B, Deckwer WD. Multiple product inhibition and growth modeling of C*lostridium butyricum* and *klebsiella pneumonia* in glycerol fermentation. *Biotechnology and Bioengineering*. 1994;44(8):902–911.

CAPÍTULO 14

Produção de Biopolímeros: Biopoliésteres

José Gregório Cabrera Gomez

Conceitos apresentados neste capítulo

Há uma enorme diversidade de biopolímeros que podem ser detectados naturalmente. Além disso, estratégias de química combinatória estão sendo utilizadas para gerar uma diversidade de compostos não naturais, mas que atendem a requisitos específicos de propriedades demandadas para determinadas aplicações, seja por modificações genéticas nos organismos produtores, seja pelo uso de estratégias de cultivo. Após uma breve introdução sobre biopolímeros em geral, este capítulo foca em diferentes aspectos da produção de biopoliésteres, que têm despertado grande interesse industrial como plásticos biodegradáveis e que podem ser produzidos a partir de matérias-primas de fácil renovação.

14.1. Introdução

Polímeros são formados por unidades repetitivas (monômeros) ligadas entre si por ligações covalentes. Os biopolímeros produzidos por microrganismos podem ser classificados em pelo menos quatro grandes categorias com base nos monômeros que os compõem: polinucleotídeos (ácidos nucleicos), polipeptídeos (aminoácidos), polissacarídeos (carboidratos) e poliésteres (ácidos hidroxicarboxílicos).

A enorme variedade de composições monoméricas dos biopolímeros, associada às possibilidades de alterar de forma controlada sua composição, seja por estratégias de modificação genética do microrganismo produtor ou de seu cultivo nos bioprocessos, atrai grande interesse sobre estes como materiais que podem ser desenvolvidos para atender demandas específicas.

14.1.1. Polinucleotídeos

Polinucleotídeos (DNA e RNA) têm um papel fundamental no armazenamento e controle da expressão da informação genética. Embora RNA seja a molécula que armazena a informação genética de alguns virus, o DNA representa a molécula armazenadora dessa informação nos organismos celulares por excelência. RNAs são o produto do processo de transcrição da informação genética (RNAs mensageiros) e participam ativamente do processo de tradução (RNAs ribossomais e RNAs transportadores), o que garante a essas moléculas seu uso em procedimento de Engenharia genética ou Biologia sintética com a construção de organismos geneticamente modificados que podem ser utilizados em diversos processos biotecnológicos. Nesse contexto, a Engenharia metabólica se insere como uma abordagem de Biologia de sistemas, pois analisa o metabolismo do organismo como um todo para estabelecer os alvos genéticos mais adequados e que permitam estabelecer células como fábricas eficientes de transformação de matérias-primas nos produtos desejados.

Diversas moléculas pequenas de RNA participam ativamente no controle da expressão gênica e são denominados RNAi (RNA de interferência). Essas moléculas podem ser utilizadas em diversos procedimentos de silenciamento gênico.

Também foram identificadas moléculas de RNA que atuam como uma espécie de “sistema imunológico bacteriano”. A informação para síntese

dessas moléculas é armazenada no genoma (CRISPR – Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, ou seja, Repetições Palindrômicas Curtas Agrupadas e Regularmente Interespaçadas) foram detectadas pela primeira vez a partir de uma experiência de detecção de ácidos nucleicos invasores e potencialmente prejudiciais à célula. Moléculas de RNA derivadas da transcrição dessa informação se juntam a nucleases (CRISPR/Cas), sendo capazes de reconhecer e degradar ácidos nucleicos de sequência específica. Sistemas CRISPR/Cas têm sido amplamente utilizados para a edição de genomas procarióticos e eucarióticos com propósitos biotecnológicos.

A produção de vacinas de DNA é outro uso no qual a produção de moléculas específicas de polinucleotídeos pode ser utilizada.

Os nucleotídeos monofosfato de inosina (IMP) ou guanosina (GMP) têm encontrado importante aplicação como intensificadores de sabor em alimentos. Suas propriedades nutricionais e farmacêuticas também despertam grande interesse. Embora estratégias de Engenharia metabólica tenham sido aplicadas para desenvolver microrganismos geneticamente modificados para a produção dos nucleosídeos inosina e guanosina, a forma clássica de obtenção de IMP e GMP consiste em extrair e quebrar o RNA para obtenção dos nucleotídeos. Estima-se que em 2010 foram produzidas e comercializadas 22.000 toneladas de IMP e GMP.

14.1.2. Polipeptídeos

Polipeptídeos microbianos podem ser produzidos em algumas circunstâncias como suprimento proteico para alimentação animal ou mesmo humana (SCP – Single Cell Protein). Entretanto, a produção desses biopolímeros é na maior parte das vezes associada à funcionalidade dessas moléculas (enzimas, anticorpos, proteínas terapêuticas ou de diagnóstico, etc).

Em geral, a sequência de aminoácidos de um polipeptídeo é determinada pela sequência de uma molécula de DNA. Isto ocorre porque o processo de síntese é dirigido por moléculas de RNA mensageiro utilizando ribossomos. Polipeptídeos de síntese não ribossomal também são encontrados e apresentam importantes aplicações como biossurfactantes (surfactina, putisolvina, etc.) ou mesmo agentes antimicrobianos (polimixina B e diversos outros). A síntese destes peptídeos é realizada por agrupamentos gênicos em que cada módulo é responsável pela incorporação de aminoácidos específicos. Esta estrutura gênica da maquinaria de síntese abre possibilidades interessantes de

genética combinatorial para síntese de peptídeos apresentando determinadas propriedades desejadas. Uma vez que estes peptídeos encontram-se associados a ácidos graxos, são denominados na literatura como lipopeptídeos.

Cianoficina é um polipeptídeo de síntese não ribossomal constituído de ácido aspártico e contendo argininas nas cadeias laterais. Inicialmente, estes polímeros foram detectados em cianobactérias, mas também são encontrados em outros grupos bacterianos. O produto de um único gene (CphA) é responsável pela ligação entre aspartato e arginina, bem como pela polimerização dos resíduos de aspartato. Poliaspartato tem demonstrado propriedades semelhantes a poliacrilatos, despertando interesse econômico na produção de cianoficinas.

14.1.3. Polissacarídeos

Diversos polissacarídeos são produzidos por bactérias, fungos, algas e plantas. Considerando apenas bactérias, os polissacarídeos são encontrados em diferentes formas: lipopolissacarídeos associados à camada externa da membrana externa de bactérias Gram-negativas; polissacarídeos capsulares ligados à superfície celular e exopolissacarídeos excretados no meio pela célula.

Uma enorme variedade de exopolissacarídeos pode ser sintetizada de forma reprodutível por microrganismos, levando a um espectro atrativo de propriedades físico-químicas e reológicas para aplicações nas áreas industriais, farmacêutica, cosmética e médica como agentes espessantes, emulsificantes, quelantes e estabilizantes.

Dextrana é um homopolissacarídeo constituído de resíduos de glicoses unidos por ligações α-1,6. É produzida a partir de sacarose que é hidrolisada e os resíduos de glicose são polimerizados pela ação de uma glucansucrase. Este foi o primeiro EPS utilizado em aplicações médicas para a complementação do volume sanguíneo. Dextrana é utilizada em diversas outras aplicações.

Levana é sintetizada pela enzima levansucrase que é excretada no meio por bactérias de diferentes gêneros. A síntese é realizada a partir de sacarose. O dissacarídeo é hidrolisado e é formado o homopolímero de frutose, contendo ligações β-2,6. Levanas apresentam propriedades muito interessantes para diferentes aplicações, entretanto, o elevado custo de produção é um fator impeditivo para seu sucesso comercial.

Xantana é o exopolissacarídeo mais importante comercialmente, principalmente devido a suas características reológicas especiais. É

formada por unidades repetitivas de cinco sacarídeos: 2 glicose, 2 manose e 1 ácido galacturônico. Os resíduos de glicose formam o esqueleto central com ligações β-1,4 (igual à encontrada na celulose). São encontrados também resíduos de piruvato e acetato ligados aos sacarídeos da cadeia lateral.

Ácido hialurônico é um exopolissacarídeo formado por resíduos de ácido glicurônico e N-acetilglicosamina unidos por ligações β-1,3 (ácido glicurônico – N-acetilglicosamina) e β-1,4 (N-acetilglicosamina – ácido glicurônico). A primeira aplicação médica para este polissacarídeo foi na reposição de humor vítreo em cirurgias dos olhos. Outras aplicações deste exopolissacarídeo incluem o tratamento de osteoartrite e ferimentos crônicos.

Pululana é um homopolímero formado por unidades repetitivas de maltotriose unidas por ligações α-1,4. É produzida pelo fungo *Aureobasidium pullulans*, bem como outras linhagens. O principal mercado para pululana é a indústria de alimentos.

Uma das grandes dificuldades do processo de produção de exopolissacarídeos é o aumento da viscosidade do meio que dificulta sua mistura, bem como processos eficientes de transferência de oxigênio, limitando a capacidade de produção.

Celulose é outro polissacarídeo que pode ser produzido por bactérias. A celulose bacteriana é pura, bem diferente daquela que pode ser obtida a partir de tecidos vegetais. Uma das mais importantes aplicações da celulose bacteriana é o uso em curativos.

14.1.4. Biopoliésteres

Biopoliésteres são acumulados por diversas bactérias como material de reserva de carbono e energia, ou seja, têm função semelhante aos triglicérides produzidos por células eucarióticas. Estes biopolímeros despertam atenção especial devido a suas propriedades termoplásticas, que permitem seu uso em diferentes aplicações nas quais polímeros petroquímicos são utilizados, com a vantagem de serem biodegradáveis e produzidos a partir de matérias-primas de fácil renovação. Alguns biopoliésteres podem ser gerados em processos químicos utilizando monômeros produzidos biologicamente e para alguns autores estes também devem ser considerados bioplásticos, uma vez que também são gerados a partir de matérias-primas de fácil renovação e, em alguns casos, são biodegradáveis.

Diante da grande diversidade de biopolímeros que podem ser produzidos, este capítulo terá a partir deste ponto a produção de biopoliésteres como foco principal.

14.2. Polihidroxialcanoatos (PHA)

Grânulos refringentes e reconhecidos como materiais de reserva de carbono e energia em diversas bactérias já eram observados ao microscópio desde o final século XIX. A natureza química desses grânulos foi desvendada por volta de 1925, quando se verificou que eram compostos por polímeros do ácido 3-hidroxibutírico, sendo denominado poli-3-hidroxibutirato (PHB ou P3HB, mais recentemente). A capacidade de acumular esses polímeros foi de pronto reconhecida como critério para classificação taxonômica de bactérias.

O interesse biotecnológico pelo P3HB se inicia na década de 1960 com a descoberta de suas propriedades termoplásticas. Durante a crise do petróleo nos anos 1970, o interesse se intensificou, sobretudo com a descoberta de monômeros adicionais que podiam ser incorporados ao polímero e que permitiam modular suas propriedades termomecânicas.

A descoberta de novos monômeros levou ao surgimento do termo mais genérico polihidroxialcanoatos (PHA), dos quais o P3HB é apenas um exemplo. Atualmente, mais de 150 monômeros diferentes foram identificados como constituintes de PHA.

A Figura 14.1 apresenta a estrutura química geral de PHA. Monômeros que foram detectados como constituintes de PHA incluem: 3-hidroxialcanoatos contendo de 3 a 16 átomos de carbono, 3-hidroxialcenoatos contendo uma ou duas insaturações, 3-hidroxialcanoatos com grupos metila em diferentes posições, hidroxialcanoatos com grupos hidroxila nas posições 4, 5 ou 6, 3-hidroxialcanoatos com grupos carboxila livres ou esterificados a grupos alquila, benzoila, fenoxi, acetoxi, para-cianofenoxi ou para-nitrofenoxi, hidroxilas secundárias, epóxi, ciano ou ainda átomos como flúor, cloro ou bromo ligados ao carbono terminal. Mais recentemente, tem se demonstrado a possibilidade de incorporação de 2-hidroxialcanoatos como constituintes de PHA, inclusive o ácido lático (2-hidroxipropionato).

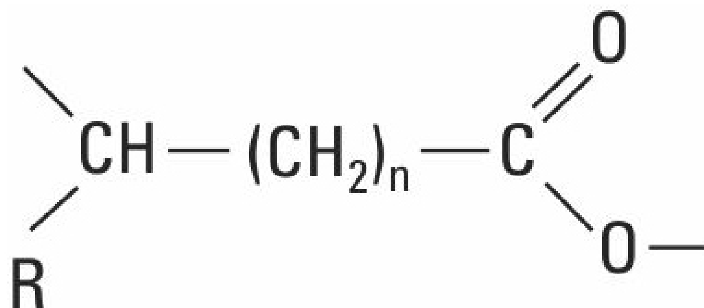


FIGURA 14.1 **Estrutura química geral de polihidroxialcanoatos.**

Embora o número de monômeros detectados em PHA seja grande, a maioria deles só foram detectados quando fontes de carbono muito específicas foram fornecidas à bactéria, assim, a diversidade de combinações possíveis ainda é bastante restrita. Os PHA têm sido classificados em dois grandes grupos com base nos monômeros que os constituem. PHA_{SCL} (short-chain-length) contém monômeros de cadeia curta, ou seja, com três a cinco carbonos na cadeia principal (C3 a C5) e PHA_{MCL} (medium-chain-length) contém monômeros de cadeia média, ou seja, com seis a dezesseis carbonos na cadeia principal (C6 a C16). PHA contendo HA_{SCL} e HA_{MCL} na mesma cadeia polimérica também têm sido detectados.

P3HB foi o primeiro dos PHA descoberto e representa o mais amplamente encontrado em bactérias isoladas de ambientes naturais (Figura 14.2). A possibilidade de outros monômeros serem incorporados à cadeia de P3HB, constituindo copolímeros, foi vislumbrada quando se detectou outros monômeros nos PHA produzidos por bactérias de sistema de tratamento de esgotos. Já naquele momento se propôs que as diferentes fontes de carbono disponíveis no sistema é que permitiam a produção de tais copolímeros.

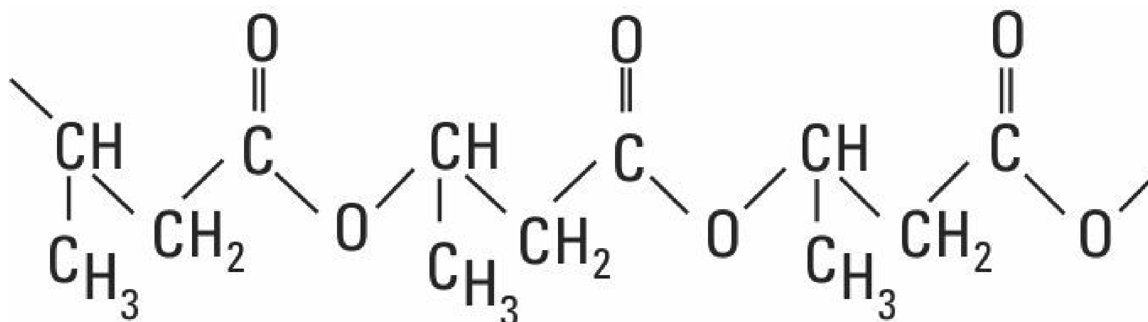


FIGURA 14.2 **Estrutura do poli-3-hidroxibutirato (P3HB).**

O uso do ácido propiônico como cossubstrato para produção de copolímeros de poli-3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato (P3HB-*co*-3HV – Figura 14.3) foi a primeira demonstração clara da possibilidade de controlar a composição do PHA com o uso de diferentes fontes de carbono e foi objeto de uma carta patente. Com base nessa descoberta, diversos outros cossubstratos foram testados e demonstrados como possíveis precursores para a inserção de diferentes monômeros ao P3HB, alguns casos com boas possibilidades de serem comercialmente viáveis, em outros, o foco foi apenas acadêmico e tinha como objetivo desvendar a especificidade da PHA sintase.

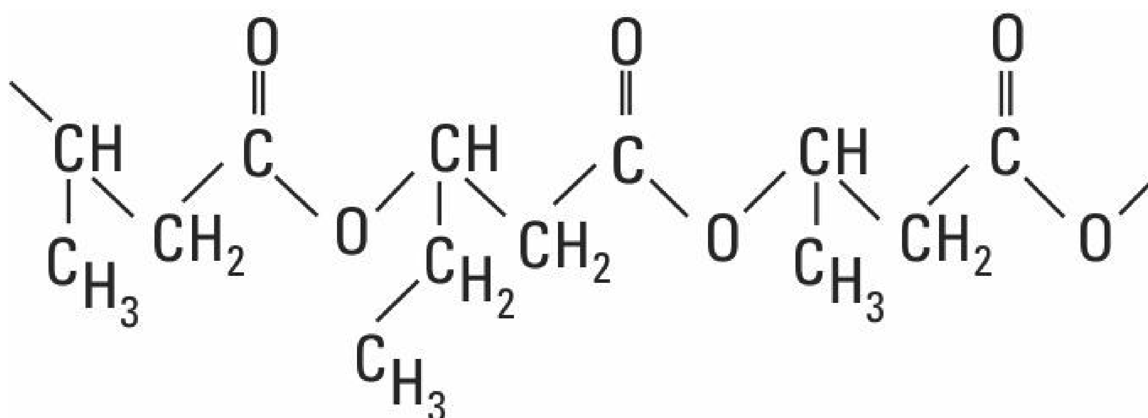


FIGURA 14.3 **Estrutura química do poli-3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxivalerato (P3HB-*co*-3HV).**

A descoberta que bactérias do gênero *Pseudomonas* capazes de acumular 3-hidroxialcanoatos contendo de 6 a 14 átomos de carbono (PHA_{MCL} – Figura 14.4) ampliou de forma expressiva o número de monômeros detectados em PHA. Estes poliésteres podem ser produzidos a partir de carboidratos ou outras fontes de carbono metabolizadas a acetil-CoA, entretanto, quando ácidos graxos (livres ou em óleos e gorduras), álcoois

ou alcanos são utilizados como fonte de carbono é que diversos monômeros podem ser inseridos ao PHA. Por exemplo, quando ácido octanoico é suprido como fonte de carbono, o polímero conterá o 3-hidroxioctanoato como principal constituinte (cerca de 90 mol%). Se ácido nonanoico é suprido, o principal constituinte do polímero será o 3-hidroxinonanoato. Monômeros contendo grupos fenil são incorporados apenas se um ácido graxo contendo esse grupo é suprido à bactéria. Por outro lado, PHA produzidos por *Pseudomonas* a partir de carboidratos contêm o ácido 3-hidroxidecanóico como principal constituinte (aproximadamente 70 mol%) e os demais constituintes detectados refletem claramente sua síntese a partir da biossíntese de ácidos graxos.

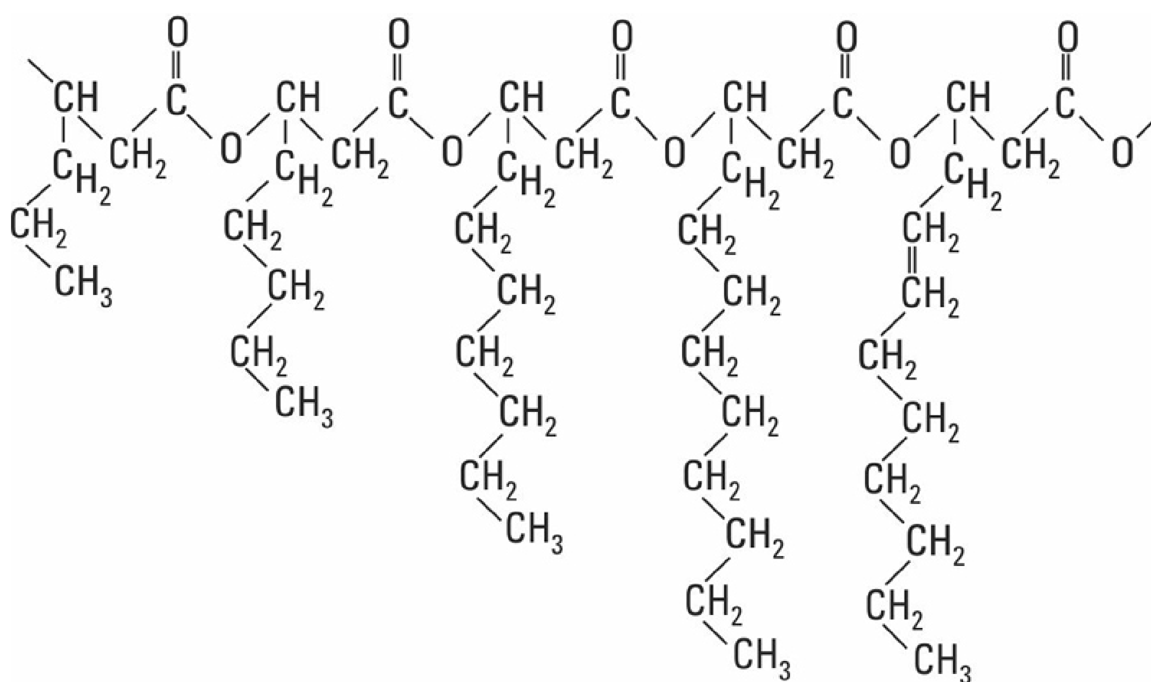


FIGURA 14.4 Estrutura química de polihidroxialcanoatos contendo monômeros de cadeia média (PHA_{MCL}).

A produção de copolímeros de poli-3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxihexanoato (P3HB-*co*-3HHx – Figura 14.5) por bactérias do gênero *Aeromonas* a partir de ácidos graxos ou óleos vegetais constitui o quarto grupo de PHA produzidos sob condições ambientais naturais.

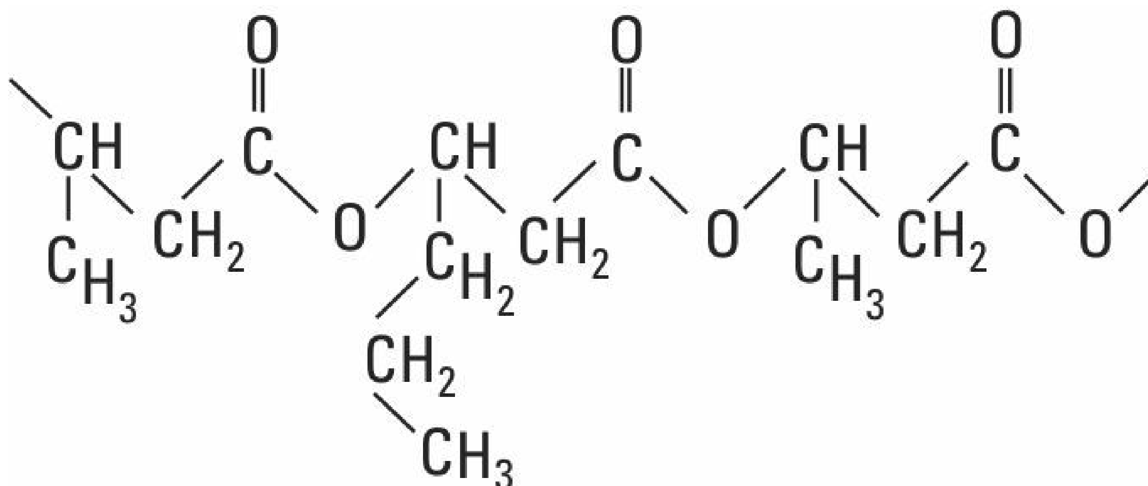


FIGURA 14.5 **Estrutura química do poli-3-hidroxibutirato-*co*-3-hidroxihexanoato (P3HB-*co*-3HHx).**

Dois outros polímeros, não produzidos naturalmente, merecem destaque dentro do grupo dos PHA por suas perspectivas de produção industrial: Poliésteres contendo 4-hidroxibutirato (4HB) como constituinte ou mesmo como homopolímeros e aqueles contendo ácido lático.

Inicialmente, polímeros contendo 4HB (Figura 14.6) foram obtidos no mesmo contexto da produção de outros copolímeros como P3HB-*co*-3HV. Isto é, com o uso de precursores específicos para o monômero 4HB, tais como: ácido 4-hidroxibutírico, γ-butirolactona ou 1,4-butanodiol. A construção de linhagens recombinantes abrigando genes de *Clostridium Kluyveri* permitiu que 4HB fosse sintetizado a partir de um intermediário do ciclo de Krebs, o ácido succínico, ou seja, o monômero pode ser produzido a partir de carboidratos ou outras fontes de carbono que não apresentavam estrutura diretamente relacionada com o monômero.

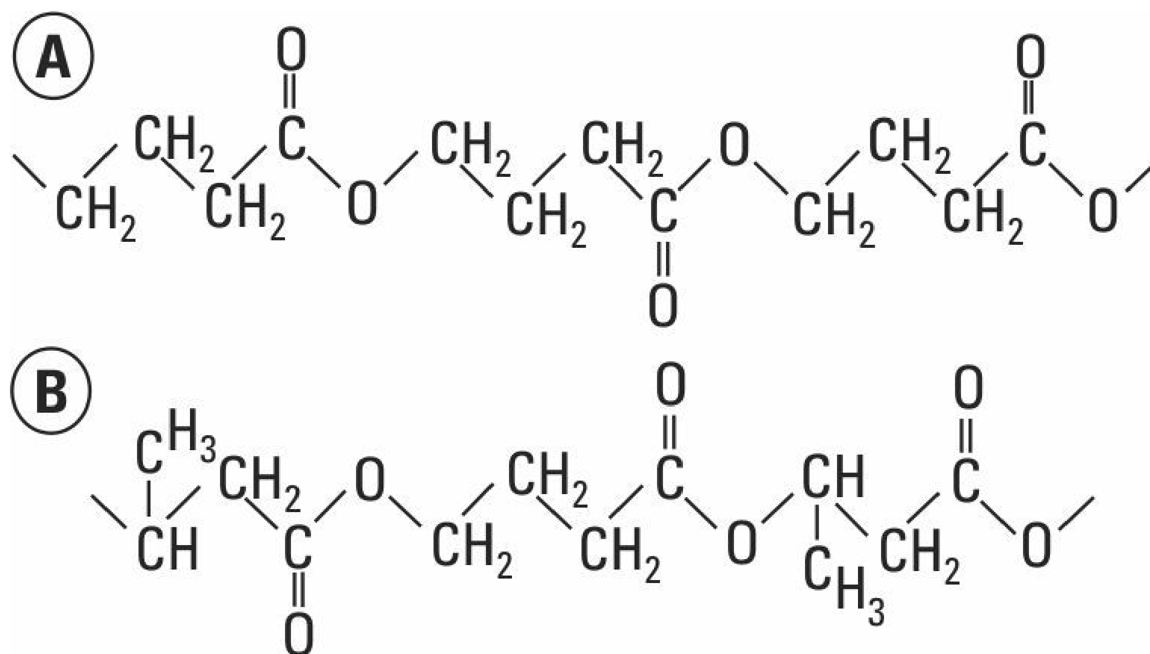


FIGURA 14.6 **Estrutura química do poli-4-hidroxibutirato (P4HB)(A) e do poli-3-hidroxibutirato-*co*-4-hidroxibutirato (P3HB-*co*-4HB)(B).**

Poliésteres contendo o ácido lático (PLA – Figura 14.7) como constituinte foram inicialmente produzidos para diferentes aplicações médicas. O acído lático pode ser produzido biotecnologicamente a partir de diferentes matérias-primas renováveis. O PLA passou a ser produzido em larga escala em 2002 pela NatureWork LLC. O PLA pode ser produzido em processos químicos a partir dos ácidos L-lático ou D-lático, gerando, respectivamente, PLLA e PDLA. A maior parte do PLA produzido atualmente é uma mistura de 95% L-lactato e 5% D-lactato, portanto, corresponde a um PLDLA. A empresa Purac (atualmente, Corbion) desenvolveu uma tecnologia de estereocomplexação, ou seja, de ligação de cadeias poliméricas de PLLA e PDLA em proporções iguais que resultam em um polímero que apresenta um aumento na temperatura de fusão de 30-60°C em relação aos homopolímeros. Estes PLA são muito mais resistentes ao calor durante o processamento.

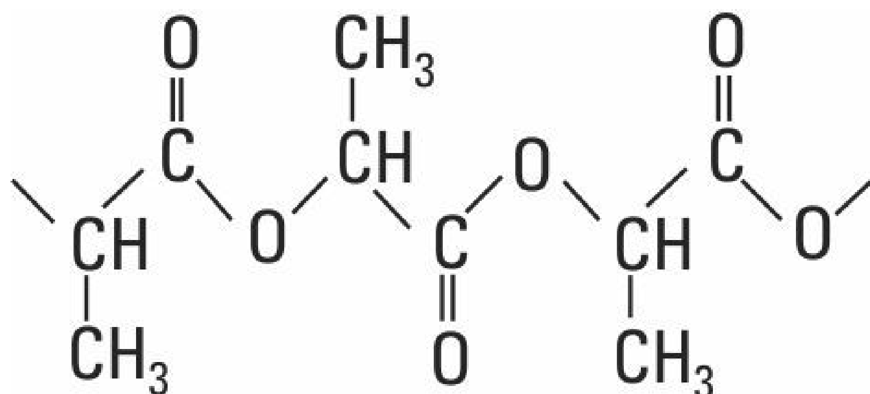
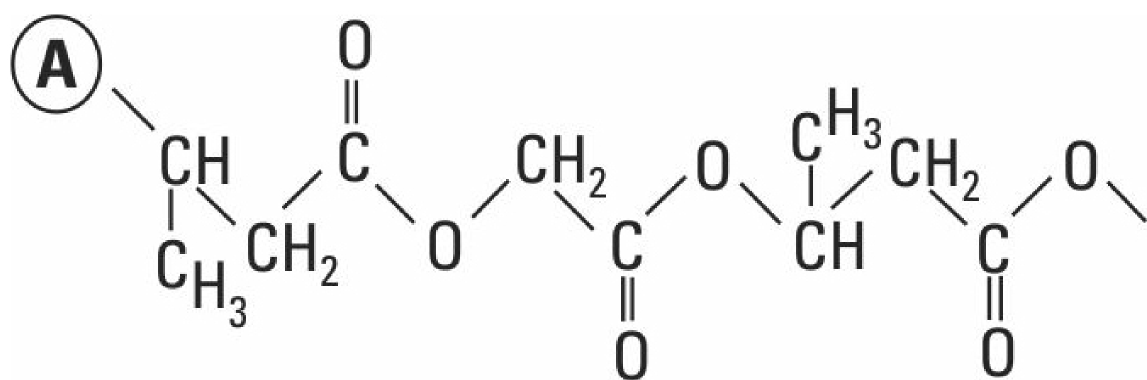
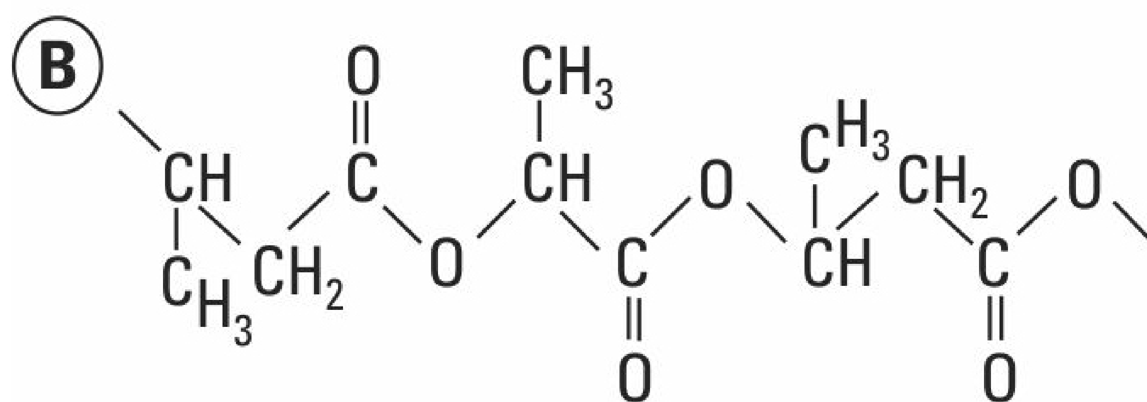


FIGURA 14.7 **PLA produzidos em processos químicos a partir de ácido lático.**

A incorporação de monômeros de ácido lático em PHA acumulados intracelularmente por bactérias foi obtida apenas com linhagens recombinantes. Foi necessário expressar simultaneamente os genes codificando para propionil-CoA transferase (PCT) e uma PHA sintase com especificidade por monômeros alterada. Além do ácido lático (2-hidroxipropionato), esse sistema foi também capaz de incorporar ao PHA: ácido glicólico (2-hidroxiacetato) e 2-hidroxibutirato. A PHA sintase parece ser incapaz de iniciar uma cadeia polimérica com apenas ácido lático. Assim, em bactérias, nunca foram produzidos homopolímeros PLA, apenas copolímeros contendo 3HB e ácido lático (Figura 14.8).





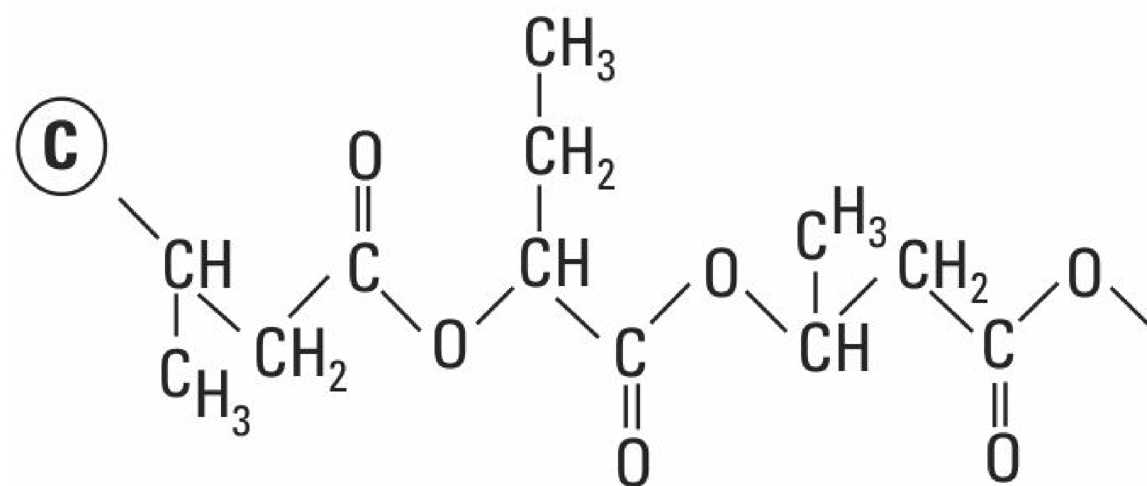


FIGURA 14.8 **PHA contendo 2-hidroxialcanoatos. A. poli-3-hidroxibutirato-*co*-glicolato; B. poli-3-hidroxibutirato-*co*-lactato; e C. poli-3-hidroxibutirato-*co*-2-hidroxibutirato.**

14.2.1. Termoplásticos

Estima-se que anualmente sejam produzidos cerca de 250 milhões de toneladas de plásticos pelo mundo todo. Este grande volume é resultado das excelentes propriedades destes materiais que apresentam vantagens sobre outros como: madeira, vidro, papel, etc. Os plásticos atualmente em uso são derivados principalmente de monômeros provenientes da indústria petroquímica.

É muito difícil imaginar a vida nos dias atuais sem os plásticos presentes, entretanto, alguns aspectos relacionados com a sustentabilidade têm colocado em cheque a produção destes polímeros.

Plásticos petroquímicos são compostos xenobióticos, isto é, são compostos estranhos ao ambiente. Muitos compostos xenobióticos são também recalcitrantes, ou seja, de difícil degradação no ambiente, pois os sistemas biológicos não possuem componentes enzimáticos capazes de decompor esses materiais e permitir sua reintegração aos ciclos biológicos naturais. Relatos têm demonstrado que plásticos podem se acumular em diferentes ambientes naturais causando sérios problemas à fauna. Assim, biodegradabilidade representa uma característica ambientalmente interessante principalmente para aqueles usos em que o material é rapidamente descartado.

Outro aspecto importante relacionado com o uso de plásticos é que as matérias-primas utilizadas para sua produção não são renováveis. A preocupação mais imediata com o uso de matérias-primas não renováveis é o aumento da emissão de gases responsáveis pelo efeito estufa. Pode-se argumentar que, como os plásticos não são facilmente degradados (ou biodegradados), não levariam à emissão de gases. Entretanto, devido a dificuldades no processo de reciclagem dos plásticos, importantes grupos têm defendido sua incineração como mecanismo de recuperar a energia neles contida. Se esse uso for difundido, plásticos, assim como o uso de outros combustíveis fósseis, serão importantes contribuintes para alterações na atmosfera, vinculados ao efeito estufa.

Polihidroxialcanoatos (PHA) podem ser considerados ambientalmente amigáveis em dois sentidos: são biodegradáveis e são sintetizados a partir de matérias-primas renováveis. Entretanto, outros materiais termoplásticos podem reunir as duas ou pelo menos uma destas características (Tabela 14.1). O ácido polilático (PLA) também reúne as duas características.

Tabela 14.1

Percentual de materiais renováveis, biodegradabilidade e fase de desenvolvimento da tecnologia de diferentes termoplásticos produzidos utilizando matérias-primas renováveis

Material	Percentual de matéria-prima renovável	Biodegradabilidade	Estágio da tecnologia
Plásticos de amido[a]	40-100	Parcial a total	Grande escala
PLA[b]	100	Total	Grande escala
PHA[c]	100	Total	Escala Piloto
PE[d]	100	Não	Grande escala
PET[e]	~30	Não	Pequena escala
PTT[f]	35	Não	Pequena escala

Fonte: Shen *et al.* (2010).

[a] amido termoplástico, amido modificado, misturas de amido e polímeros petroquímicos.

[b] ácido polilático (PLA) produzido pela polimerização do ácido lático, gerado em processo biotecnológico.

[c] P3HB, P3HB-*co*-3HV, P3HB-*co*-3HHx, P3HB-*co*-4HB, P4HB.

[d] Etanol é convertido em etileno, polimerizado para gerar o PE de base biológica (biobased PE).

[e] Etileno é gerado a partir do etanol (bioetanol) e polimerizado com ácido tereftálico (petroquímico).

[f] 1,3-propanodiol é gerado em processo biotecnológico e polimerizado com ácido tereftálico (petroquímico).

Tecnologias estão disponíveis para a produção de alguns polímeros a partir de matérias-primas renováveis com a mesma composição daqueles gerados por rotas petroquímicas. A grande vantagem é que apresentam as mesmas propriedades termomecânicas daqueles produzidos por rotas petroquímicas, podendo substituir estes em 100% das aplicações, tecnicamente. Entretanto, permanecem como compostos xenobióticos e recalcitrantes, não sendo biodegradáveis. Caso os polímeros sejam mantidos de forma adequada para evitar sua degradação, esse pode ser um mecanismo de sequestro de carbono, ou seja, ao invés de promover a emissão de gases do efeito estufa, permitiria a retirada destes da atmosfera. Alguns polímeros são gerados utilizando apenas parte de matéria-prima renovável, como o PET e PTT. Estes polímeros utilizam etileno e trimetileno, que podem ser gerados a partir das matérias-primas renováveis: etanol e 1,3-propanodiol, respectivamente. Entretanto, também

utilizam ácido tereftálico que ainda não é produzido de matérias-primas renováveis.

Existe também exemplo de polímero biodegradável, mas produzido a partir de matérias-primas não renováveis. Este é o caso da poli-ε-caprolactama. A ε-Caprolactama e o ácido tereftálico são alvo de trabalhos científicos que buscam tornar possível sua produção a partir de matérias-primas renováveis.

Com base em entrevistas feitas com especialistas das indústrias de termoplásticos, estimou-se o potencial máximo de substituição técnica de plásticos petroquímicos por diferentes plásticos gerados com matérias-primas renováveis (Tabela 14.2).

Tabela 14.2

Potencial máximo de substituição técnica de plásticos petroquímicos por plásticos gerados com matérias-primas renováveis

Materiais	Percentual máximo de substituição técnica						Quantidade substituída[a]
	PEBD	PEAD	PP	PVC	PS	PET	
Plásticos de amido	8	8	8		8		10.304,4
PLA		10	10		10	20	12.270,1
PHA[b]	20	20	10	10	20	10	26.348,8
PE[c]	72[d]	62[d]					45.746,0
PP[c]			67[d]				30.083,0
PET[c]						50[d]	7.749,0
PTT			5			20	5.344,6
Consumo global (2007)[a]	37.100	30.700	44.900	35.280	16.105	15.498	137.845,9/179.583 (76,8%)

Fonte: Shen *et al.* (2010).

[a] Em 1000 toneladas.

[b] P3HB, P3HB-*co*-3HV, P3HB-*co*-3HHx, P3HB-*co*-4HB, P4HB.

[c] Produzidos a partir de matérias-primas renováveis.

[d] Em princípio, uma vez que apresentam exatamente a mesma composição química de seus congêneres petroquímicos, estes polímeros poderiam substituir tecnicamente 100%. Aqui foi considerada apenas a substituição que complementa aquela dos outros polímeros.

Estima-se que PHA podem substituir tecnicamente cerca de 25 milhões de toneladas dos principais plásticos de origem petroquímica. Este valor corresponde a cerca de 15% dos principais plásticos e 10% de todos os plásticos produzidos. Polímeros produzidos a partir de matérias-primas

renováveis como um todo têm o potencial técnico de substituir quase 80% dos polímeros petroquímicos. Este número atinge cerca de 90% se outros polímeros que podem ser gerados a partir de biomassa são considerados.

A questão que fica é se esse potencial técnico pode de fato ser realizado. No momento em que o preço do petróleo atingiu valores superiores a US$100/barril, muitas empresas, inclusive do setor petroquímico, voltaram sua atenção para o desenvolvimento de tecnologias de produção baseadas no uso da biomassa como principal matéria-prima (*biobased products*). As propostas relacionadas com o estabelecimento de biorrefinarias, muitas delas associadas às usinas de açúcar e álcool, passaram a fazer parte da agenda de muitas empresas. A crise econômica em 2008-2009, associada ao desenvolvimento de tecnologias de extração que permitiram ampliar a oferta de petróleo e gás natural, sobretudo em países não vinculados à OPEP, levou a reduções expressivas no preço do petróleo. Além disso, o gás natural proveniente das reservas de xisto betuminoso, em substituição ao uso de carvão natural, tem sido visto nos Estados Unidos como uma alternativa para redução das emissões de gases do efeito estufa. Este cenário é realmente desafiador para o estabelecimento de tecnologias com o uso de biomassa como matéria-prima. Análises ambientais mais abrangentes facilmente demonstrarão que alternativas aos combustíveis fósseis precisam ser geradas urgentemente. A questão será então em que medida as sociedades e os governos adotarão medidas para avançar nesses caminhos, ainda que economicamente não pareçam interessantes. Embora o cenário atual indique que o peso da balança está pendendo muito mais na direção dos interesses econômicos, não é preciso grande poder de previsão para visualizar que questões ambientais terão cada vez mais importância, fazendo a balança pender para o outro lado. Assim, pelo menos a academia (universidades e institutos de pesquisa) deve estar preparada com a oferta de tecnologias que permitam avanços nessa direção.

14.2.2. Metabolismo de PHA

A síntese de PHA depende da fonte de carbono fornecida às bactérias, das vias metabólicas presentes nestas, que permite a síntese de diferentes monômeros, e da especificidade da PHA sintase que determina os monômeros que serão inseridos à cadeia do PHA (Figura 14.9). PHA sintase é a enzima chave no processo de produção de PHA por bactérias e catalisa a incorporação de monômeros ao polímero.

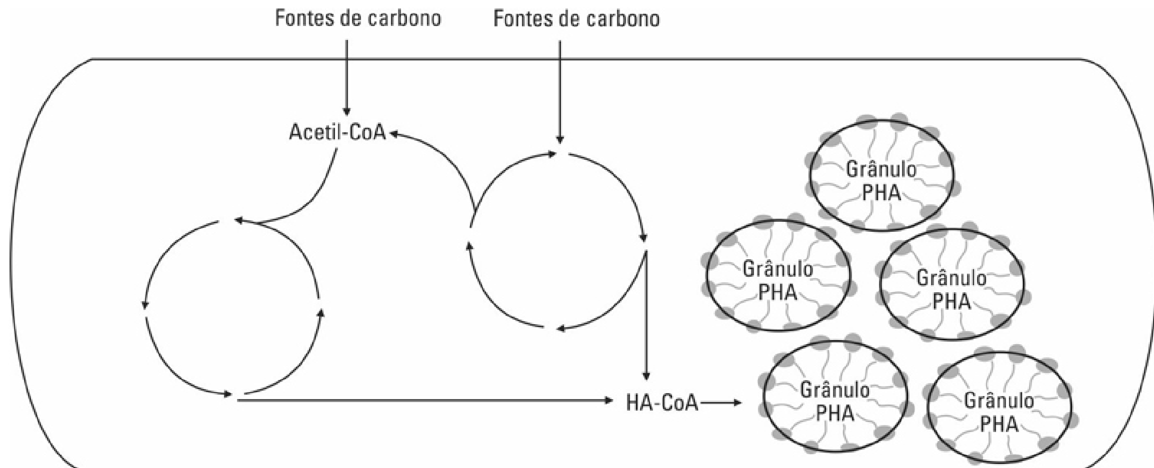


FIGURA 14.9 Biossíntese de PHA em bactérias.

14.2.2.1. Biossíntese de P3HB

Existem duas vias principais a partir das quais podem ser gerados os monômeros 3HB (Figura 14.10). O primeiro destes caminhos é a produção de 3HB a partir de acetil-CoA, um intermediário do metabolismo central que pode ser gerado a partir de diferentes fontes de carbono. Acetil-CoA é o produto final da degradação de carboidratos (glicose, frutose, xilose, galactose, manose etc.) pelas vias de Embden-Meyerhoff-Parnas, Entner-Doudoroff, fosfocetolases e pentoses fosfato. Também é formado a cada ciclo da β-oxidação de ácidos graxos. A síntese de P3HB a partir de acetil-CoA é realizada em três passos enzimáticos: inicialmente duas moléculas de acetil-CoA são condensadas pela ação de uma β-cetotiolase (PhaA), formando acetoacetil-CoA (também denominada 3-cetobutiril-CoA); que é reduzido a (*R*)-3-hidroxibutiril-CoA (*R*-3HB-CoA) pela ação de uma 3-cetoacil-CoA redutase NADPH dependente (PhaB); por fim, os monômeros 3HB são incorporados à cadeia polimérica pela ação da PHA sintase (PhaC), liberando a coenzima A livre (CoASH).

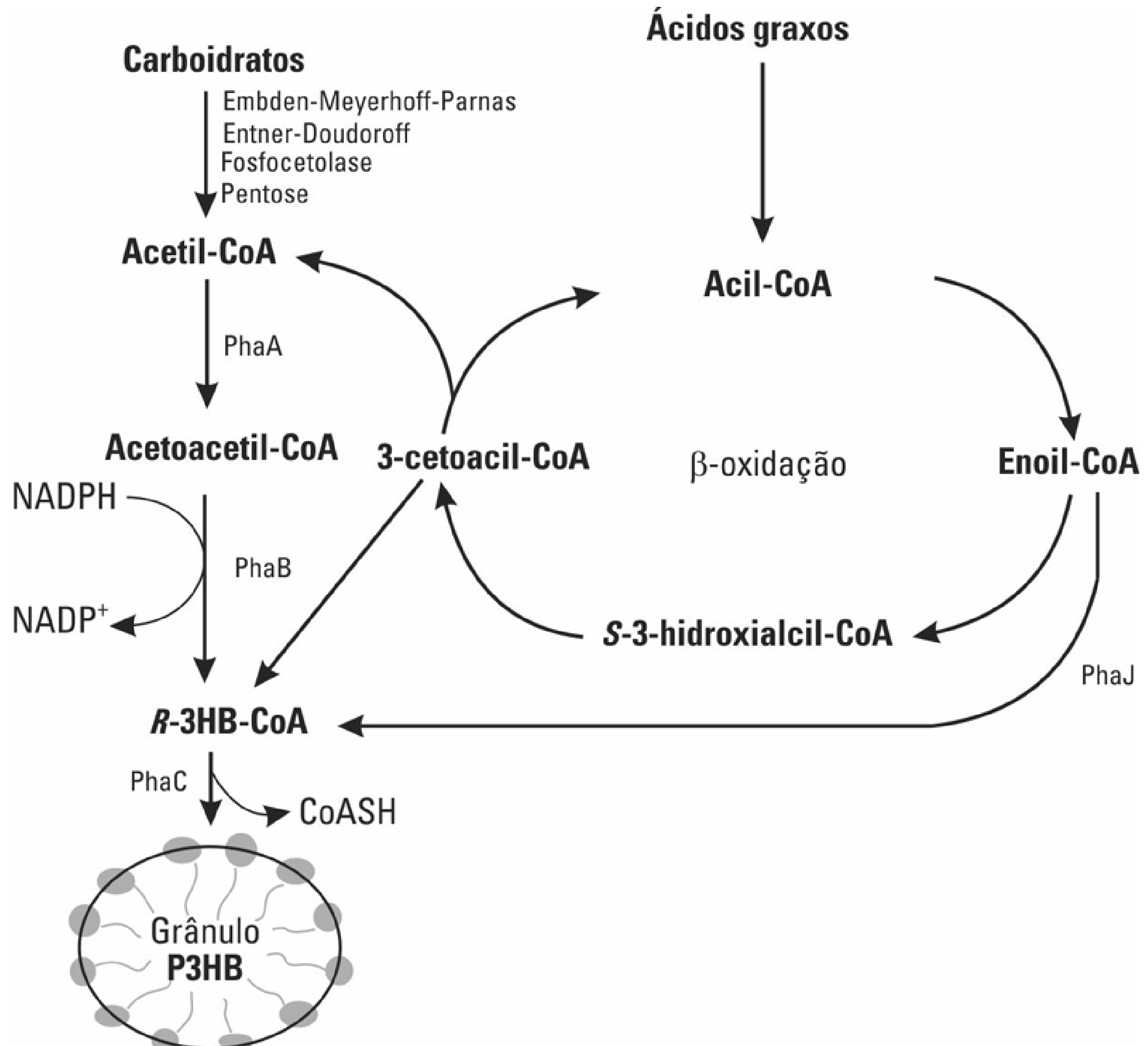


FIGURA 14.10 Vias metabólicas de produção de P3HB. PhaA (β-cetotiolase); PhaB (acetoacetil-CoA redutase NADPH dependente); PhaC (PHA sintase); PhaJ (enoil-CoA hidratase R-dependente).

A rota alternativa de produção de 3HB é a β-oxidação de ácidos graxos. Essa via, a cada ciclo, retira dois átomos de carbono do ácido graxo sendo metabolizado. Assim, após um determinado número de ciclos de β-oxidação, são gerados intermediários contendo 4 átomos de carbono e estes podem ser convertidos em *R*-3HB-CoA, seja pela ação de uma enoil-CoA hidratase R-específica (PhaJ), seja por uma 3-cetoacil-CoA NADPH dependente (PhaB). A Figura 14.10 apresenta as vias metabólicas de produção de P3HB.

14.2.2.2. Biossíntese de P3HB-co-3HV.

A estratégia inicial descoberta de produção de P3HB-*co*-3HV consistia em adicionar um cossubstrato precursor de unidades 3HV, sendo o ácido propiônico utilizado para essa finalidade. A Figura 14.11 apresenta a via metabólica de síntese do copolímero P3HB-*co*-3HV a partir de carboidratos e ácido propiônico. A síntese de unidades 3HB ocorre como descrito no item anterior. As unidades 3HV são sintetizadas pela condensação de acetil-CoA e propionil-CoA por uma β-cetotiolase (BktB, não PhaA), formando 3-cetovaleril-CoA; que é reduzido a *R*-3-hidroxivaleril-CoA pela ação da 3-cetoacil-CoA redutase NADPH dependente (PhaB). Por fim, as unidades 3HV, bem como 3HB, são incorporadas à cadeia polimérica pela ação da PHA sintase (PhaC). A fração molar de cada um desses monômeros dependerá da proporção relativa do substrato e cossubstrato supridos, da velocidade de metabolização de cada um destes e da especificidade da PHA sintase pelos diferentes monômeros. Ou seja, é possível controlar a composição do copolímero produzido, manipulando-se a oferta das fontes de carbono.

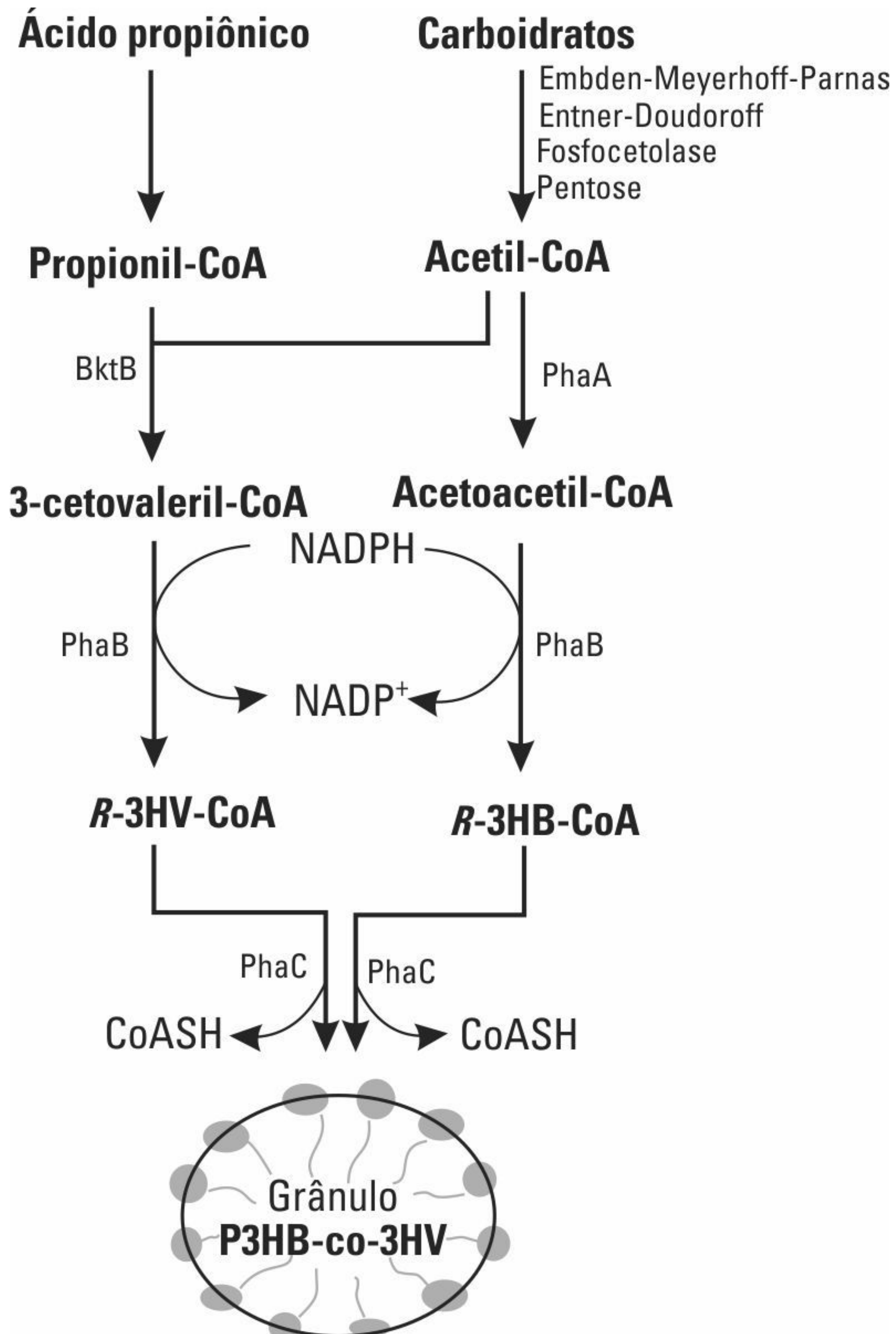


FIGURA 14.11 **Biossíntese de P3HB-*co*-3HV a partir de carboidratos e ácido propiônico.**

Outros cossubstratos podem ser utilizados como precursores de unidades 3HV, tais como: ácidos valérico, heptanoico e nonanoico, propanol, pentanol, etc. Todos estes contêm um esqueleto carbônico com número ímpar de carbonos.

Copolímeros do tipo P3HB-*co*-3HV também podem ser sintetizados por algumas bactérias (*Rhodococcus*, *Nocardia* etc.) a partir de carboidratos. Para isso, essas bactérias são capazes de converter succinil-CoA em propionil-CoA por uma rota metabólica que tem o metilmalonil-CoA como intermediário.

14.2.2.3. Biossíntese de PHA_{MCL}.

PHA_{MCL} podem ser sintetizados a partir de carboidratos e outras fontes de carbono metabolizadas a acetil-CoA, bem como a partir de ácidos graxos. Bactérias do gênero *Pseudomonas* são as principais produtoras destes polímeros.

Quando carboidratos são supridos como fonte de carbono, os monômeros são sintetizados na via de biossíntese de ácidos graxos a partir de acetil-CoA (Figura 14.12). A cada ciclo de biossíntese, o ácido graxo tem sua cadeia de carbono estendida em dois carbonos. Assim, os monômeros constituintes do PHA têm sempre número par de carbonos. O principal monômero detectado como constituinte destes polímeros é o 3-hidroxidecanoato (3HD), normalmente correspondendo a cerca de 60-70% dos monômeros no PHA_{MCL}. O 3-hidroxioctanoato (3HO) corresponde a 20-25% dos monômeros; 3-hidroxihexanoato (3HHx), 3-hidroxidodecanoato (3HDd) e 3-hidroxi-5-dodecenoato ($3HDd\Delta_5$) correspondem, cada um, a cerca de 5% ou menos dos monômeros. Esta composição do poliéster reflete a especificidade da PHA sintase (PhaC) e também da enzima ACP-CoA transacilase (PhaG), responsável pela canalização de intermediários da biossíntese de ácidos graxos para reação de polimerização.

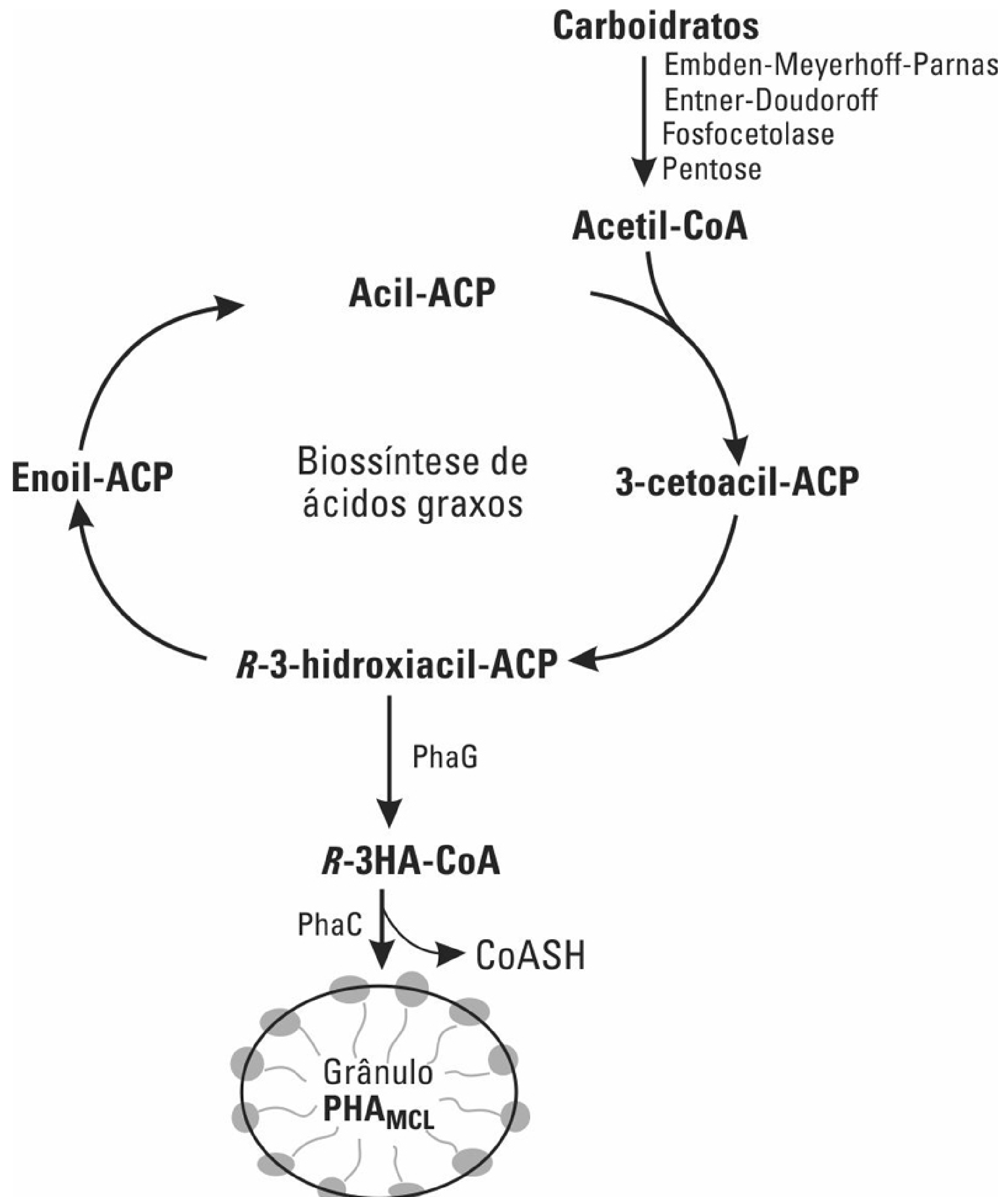


FIGURA 14.12 **Biossíntese de PHA_{MCL} a partir de carboidratos.**

Na biossíntese de PHA a partir de ácidos graxos, os monômeros serão gerados a partir da metabolização destes na β-oxidação de ácidos graxos (Figura 14.13). A β-oxidação envolve a retirada de dois carbonos do ácido graxo a cada ciclo, na forma de uma molécula de acetil-CoA. Os monômeros que serão gerados dependem, portanto, da estrutura química

do ácido graxo suprido. O uso de ácidos graxos permite que vários monômeros possam ser inseridos ao PHA. O uso de diferentes óleos vegetais ou gorduras animais, que têm diferentes composições de ácidos graxos em seus triglicérides, permite a produção de PHA com composições diversas e que podem ser controladas.

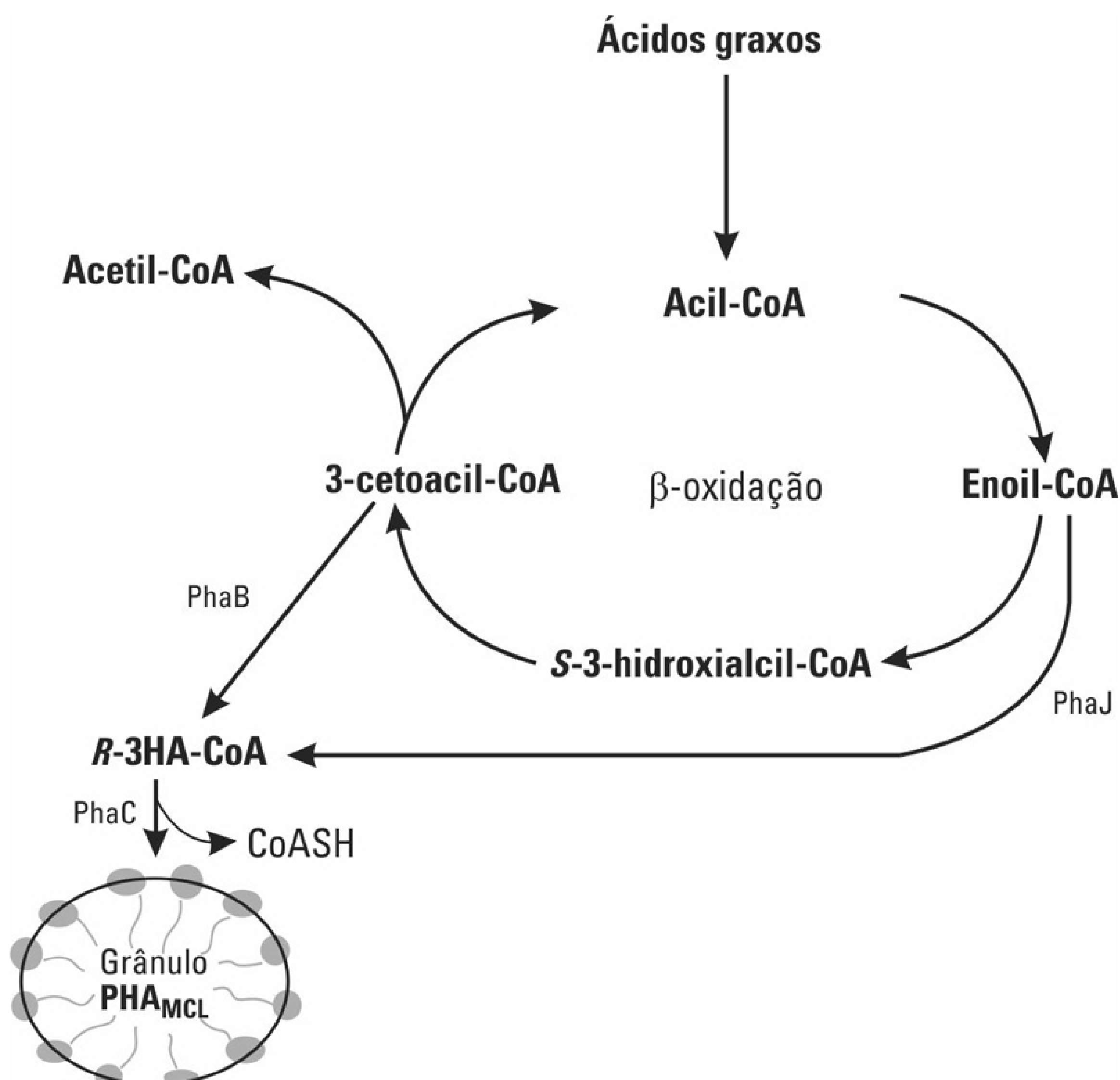


FIGURA 14.13 **Biossíntese de PHA_{MCL} a partir de ácidos graxos.**

14.2.2.4. Biossíntese de P3HB-co-3HHx.

A capacidade de produção dos copolímeros P3HB-*co*-3HHx foi verificada quase que por acaso em trabalho que selecionava bactérias produtoras de PHA a partir de óleos vegetais desenvolvido na década de 1990. Trabalhos posteriores demonstraram que ácidos graxos livres também poderiam ser utilizados para a produção destes polímeros. As bactérias apresentando essa capacidade foram todas identificadas como pertencendo ao gênero *Aeromonas*. A partir de carboidratos estas bactérias são incapazes de produzir qualquer PHA e estão especializadas em produzir estes polímeros a partir de ácidos graxos. Esta especialização reflete-se na organização do operon de biossíntese de PHA, que é constituído por três genes *phaP*, *phaC* e *phaJ*. PhaP foi anotada como uma PHAsina (proteína estrutural do grânulo de PHA), que recentemente se demonstrou ter uma importante função na ativação de PhaC (PHA sintase). PhaJ é uma enoil-CoA redutase *R*-dependente que permite a canalização de intermediários da β-oxidação de ácidos graxos para a polimerização pela PHA sintase (Figura 14.14).

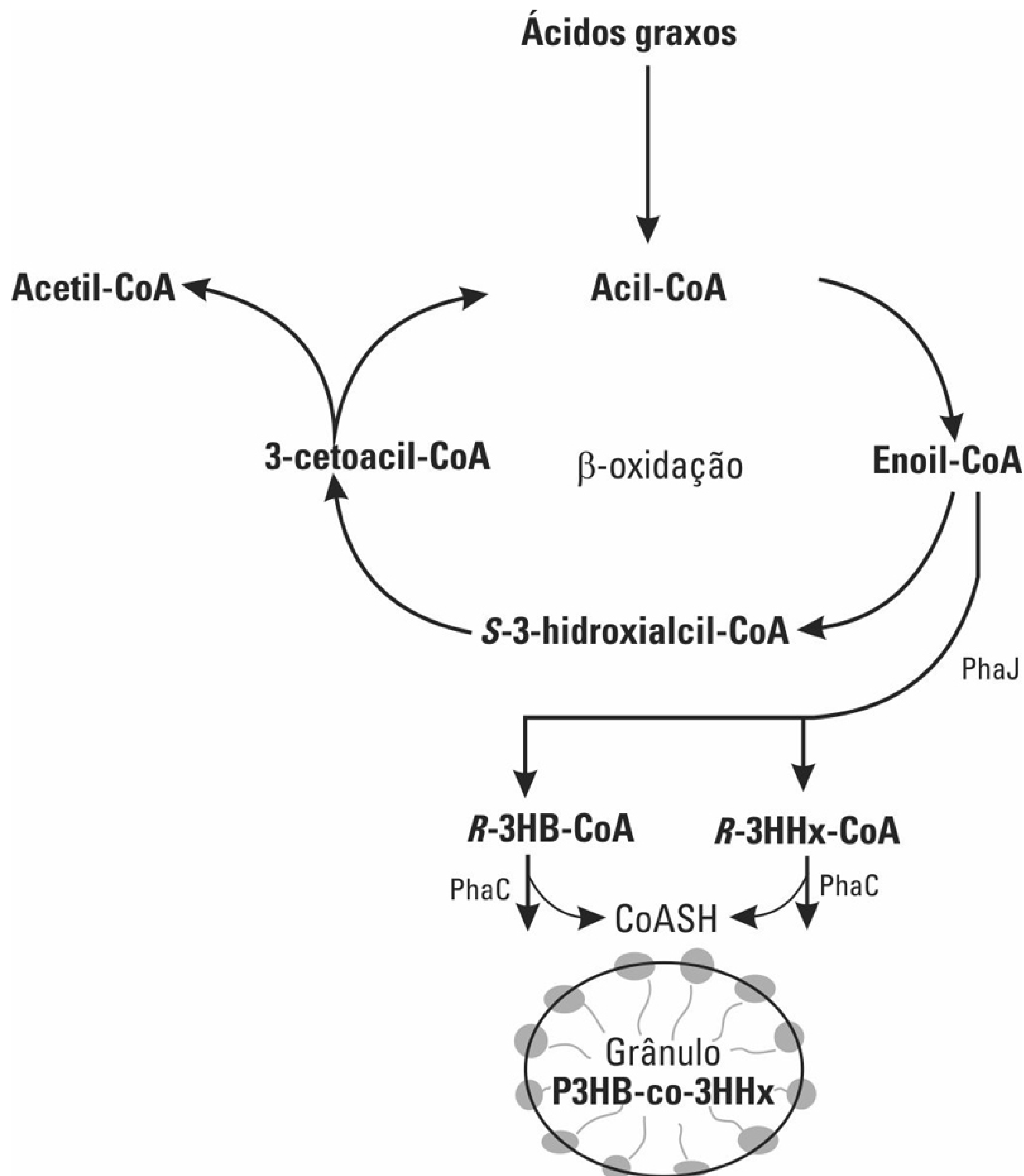


FIGURA 14.14 **Biossíntese de P3HB-*co*-3HHx por bactérias do gênero *Aeromonas*.**

14.2.2.5. Biossíntese de P4HB e copolímeros P3HB-co-4HB.

A inserção de 4HB como monômero em PHA foi conseguida inicialmente com a utilização de fontes de carbonos com estruturas relacionadas com

esses monômeros; 4-hidroxibutirato, γ-butirolactona e 1,4-butanodiol foram as fontes de carbono utilizadas para essa finalidade. A rota de síntese dos monômeros 4HB utilizando fontes de carbono não relacionadas envolve a expressão de genes que permitem a conversão de ácido succínico, um intermediário do ciclo de Krebs, em 4-hidroxibutirato. Inicialmente, succinato é convertido em succinato-semialdeido e em seguida a 4-hidroxibutirato. Para que 4-hidroxibutirato possa ser utilizado pela PHA sintase, este é convertido a 4HB-CoA pela ação de uma 4-hidroxibutirato CoA transferase (Figura 14.15).

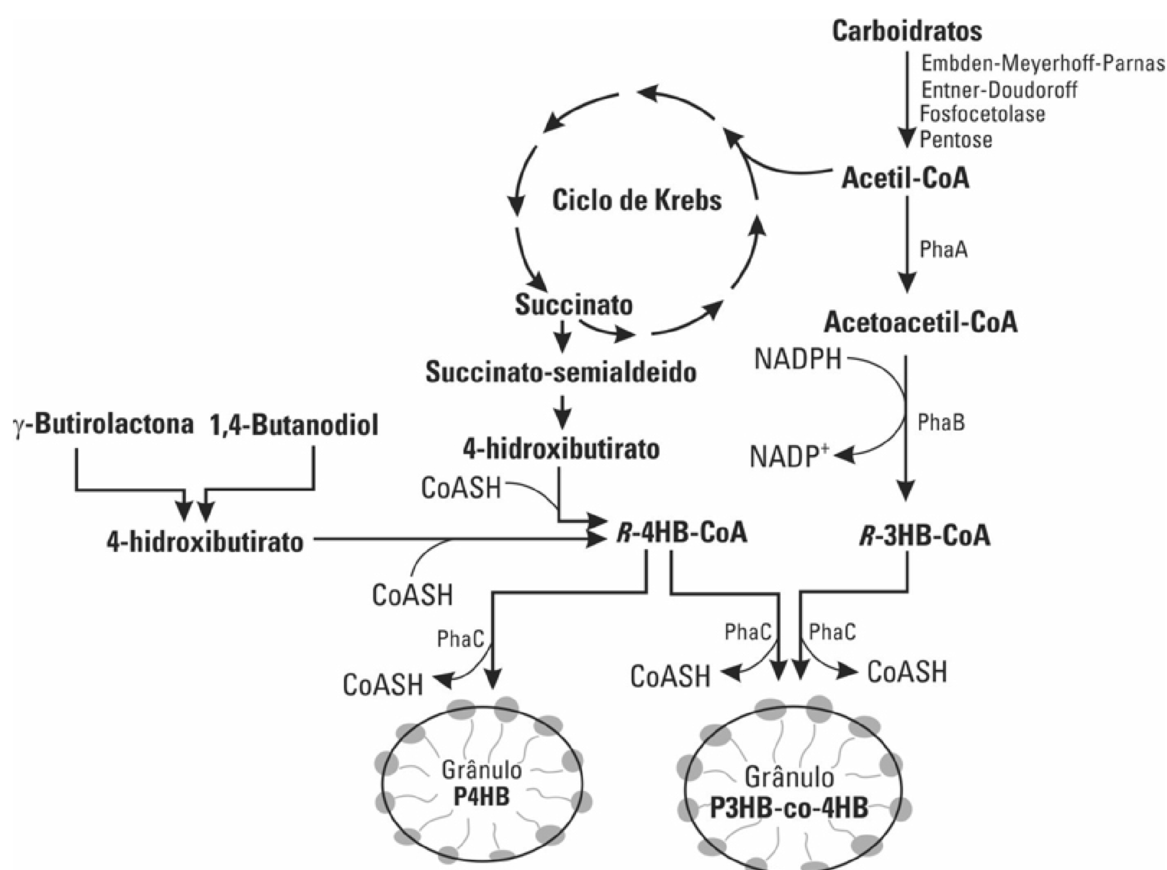


FIGURA 14.15 **Biossíntese de P4HB e P3HB-*co*-4HB.**

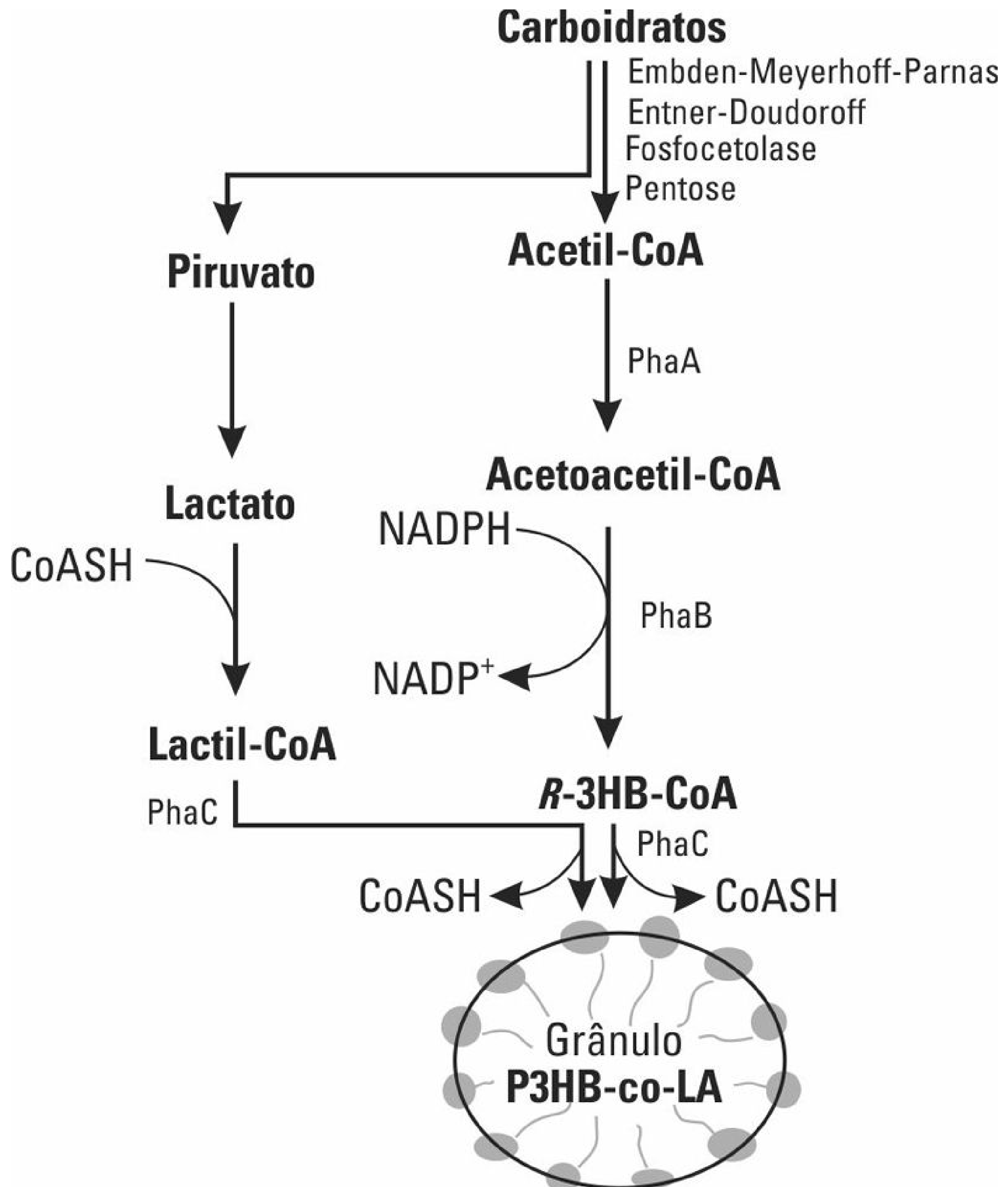


FIGURA 14.16 **Biossíntese de P3HB-*co*-LA.**

14.2.2.6. Biossíntese de poliésteres contendo 2-hidroxiácidos

A capacidade de PHA sintases incorporarem ácido lático (2-hidroxipropionato) foi investigada desde a década de 1990 em estudos da

atividade desta enzima *in vitro*. Embora de início se imaginasse que enzimas com especificidade maior por monômeros 3HB seriam as mais promissoras para se atingir esse objetivo devido à semelhança maior dos substratos, foi com enzimas modificadas a partir daquelas presentes em bactéria do gênero *Pseudomonas* que se conseguiu a incorporação de lactato ao PHA.

Outro fator fundamental para produção de PHA contendo lactato em sua composição foi utilizar linhagens de *E. coli* modificadas de forma a proporcionar um maior suprimento dos monômeros à PHA sintase. Embora esforços tenham sido direcionados à produção de PLA pelas PHA sintases, até o momento foram obtidos apenas copolímeros P3HB-*co*-LA, com o máximo de 96 mol% de LA. Os copolímeros de P3HB-*co*-LA apresentam propriedades mecânicas claramente distintas do PLA e do P3HB, permitindo ampliar as possibilidades de aplicações.

A capacidade de a PHA sintase modificada incorporar também o ácido glicólico (2-hidroxiacetato) foi demonstrada em cultivos utilizando ácido glicólico e decanoato como fontes de carbono.

P2HB pode ser produzido por um processo químico de polimerização. Entretanto, este polímero apresenta propriedades muito variadas devido à proporção de enantiômeros R ou S incorporados. A PHA sintase modificada capaz de incorporar lactato ao PHA também foi capaz de incorporar 2HB, mas apenas na configuração R. Neste caso, um homopolímero de P2HB pode ser obtido.

14.2.3. Produção de PHA

Processos de produção de PHA, assim como vários outros bioprocessos microbianos, podem ser separados em três etapas. A etapa central do processo é o cultivo do microrganismo de forma a obter o crescimento deste e o acúmulo de quantidades expressivas do polímero. Diversas operações antecedem o cultivo em biorreator, como a esterilização do biorreator e de matérias-primas e o preparo de um inóculo adequado. A etapa posterior ao cultivo envolve a recuperação da biomassa do reator, a extração e purificação do produto formado e uma destinação adequada de todos os efluentes do processo.

O custo de produção de PHA está relacionado com três componentes principais, contribuindo de forma semelhante ao processo como um todo.

O primeiro componente do custo de produção são as matérias-primas, especialmente a(s) fonte(s) de carbono. O uso de fontes de carbono de baixo custo, ou mesmo resíduos agrícolas ou industriais, representa a

principal estratégia para minimizar o impacto da fonte de carbono sobre o custo de produção. É importante destacar que o custo da fonte de carbono não pode ser considerado isoladamente. O binômio custo da fonte de carbono e eficiência de conversão desta no produto é que determinarão o impacto deste componente no custo de produção. A eficiência máxima de conversão de uma fonte de carbono em um determinado PHA pode ser estimada analisando-se as vias metabólicas envolvidas no processo.

A análise de uma série de isolados de solo de canavial revelou que a conversão de carboidratos em P3HB podia ser realizada com a máxima eficiência teórica (metabólica) por algumas bactérias. Entretanto, a conversão de propionato em unidades 3HV ocorria com uma eficiência muito aquém do valor máximo teórico. Estas informações foram importantes para estabelecer estratégias para obtenção de linhagens ou processos que permitissem atingir a eficiência máxima possível.

O segundo fator importante impactando o custo de produção é o investimento na planta de produção. Minimizar este componente no custo total implica obter processos com maiores produtividades. A estratégia mais eficaz em se aumentar a produtividade em um processo biotecnológico microbiano envolve o estabelecimento de cultivos em alta densidade celular. Embora diferentes processos de produção de PHA tenham sido avaliados, os cultivos em batelada alimentada têm sido aqueles que têm atraído maior interesse, pois permitem atingir as maiores produtividades. Produtividades volumétricas de até 4 g/L.h têm sido reportadas para produção de PHA. Esses valores foram obtidos, entretanto, apenas em cultivos em biorreator em escala de bancada (menor que 10 L). Valores entre 2 e 3 g/L.h são possíveis de ser obtidos mesmo em escala industrial. Estima-se que produtividades volumétricas de 1 g/L.h podem tornar o processo de produção competitivo para algumas aplicações. Os maiores valores de produtividade foram obtidos com cultivos em alta densidade celular (cerca de 200 g/L) contendo mais que 70% de PHA acumulado.

A Figura 14.17 apresenta o perfil cinético em um processo de produção de PHA em duas fases de cultivo. Na primeira fase (crescimento celular), são oferecidos todos os nutrientes para proporcionar a multiplicação exponencial da população bacteriana com baixo teor ou nenhum PHA acumulado. Na segunda fase do cultivo (acúmulo de PHA), a(s) fonte(s) de carbono é(são) suprida(s) na ausência de um nutriente essencial à multiplicação celular, permitindo que um PHA de composição determinada pela(s) fonte(s) de carbono suprida(s) seja produzido. Neste cultivo, foram consideradas as velocidades específicas de crescimento e

produção de PHA de 0,30 h^{-1} e 150 mg/g.h, respectivamente. Considerou-se ainda que o processo foi dimensionado de tal forma que a fase de multiplicação celular deveria ocorrer até atingir aproximadamente 30 g/L de biomassa residual (biomassa total menos o polímero acumulado). Neste processo ainda, se atingiriam produtividades volumétricas de aproximadamente 2,0; 2,3 ou 2,6 g/L.h, caso a fase de produção de PHA se estendesse até o acúmulo de PHA correspondendo a aproximadamente 70, 75 ou 80% da massa seca celular, respectivamente.

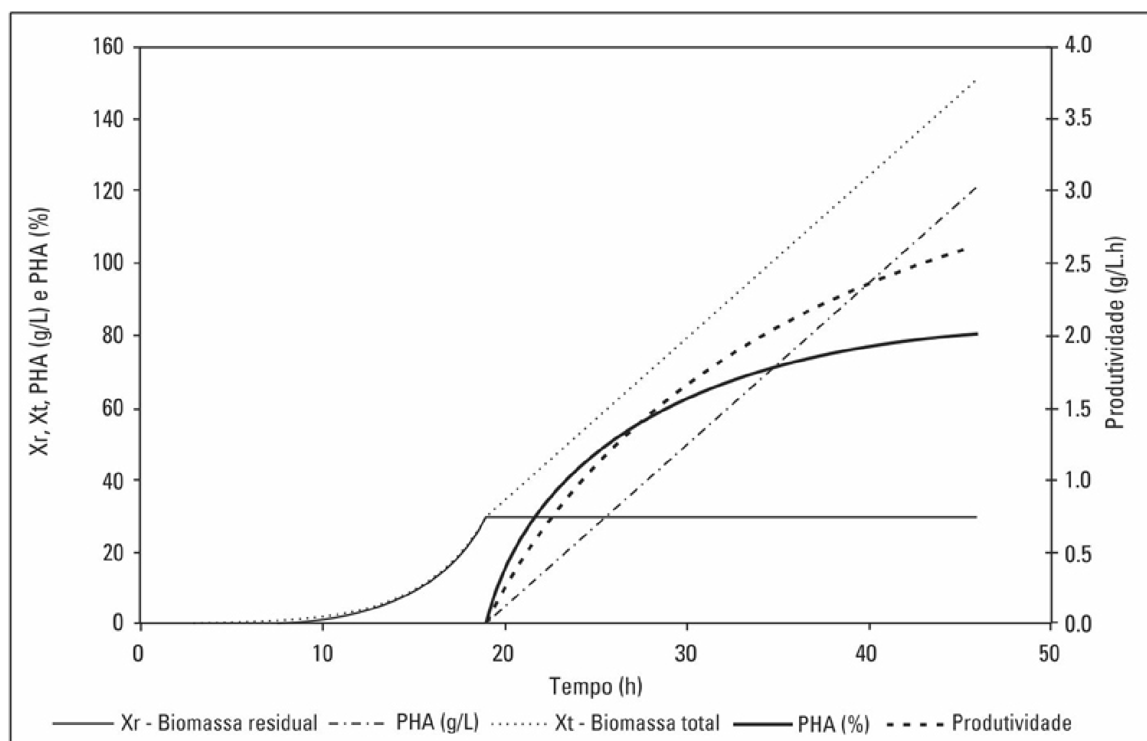


FIGURA 14.17 Perfil cinético de processo de produção de PHA em duas fases de cultivo. Foram considerados: velocidade específica de crescimento e acúmulo de PHA de 0,30 h^{-1} e 150 mg/g.h.

O terceiro fator importante para o custo de produção de PHA é a extração e purificação. Com relação a este item, as operações unitárias que serão utilizadas para obter o polímero com o grau de pureza necessário serão determinantes. O principal processo de purificação de PHA envolve o uso de solvente(s) para a extração do polímero seguido do uso de um não solvente para precipitação. Os solventes devem ser criteriosamente recuperados no processo, de forma a não comprometer a relevância do produto como ambientalmente amigável. O uso de enzimas para digestão

dos componentes da biomassa exceto o PHA também tem sido proposto, mas o custo das enzimas é o principal fator que compromete economicamente esta estratégia. Agentes oxidantes da biomassa também têm sido propostos e seu uso é limitado principalmente pela quebra de cadeias poliméricas que compromete as propriedades termomecânicas do polímero.

Um componente interfere simultaneamente nos três principais componentes do custo de produção: o teor de PHA acumulado intracelularmente. Quanto maior for o teor de PHA acumulado, maior será a eficiência de conversão da fonte de carbono no produto, pois proporcionalmente menos carbono será utilizado para síntese da biomassa celular em relação ao polímero. Quanto maior o teor de PHA, maior a concentração de PHA que pode ser atingida e dessa forma a produtividade do processo. Quanto maior o teor de PHA acumulado mais simples será o processo de purificação, pois menos massa não polimérica deve ser removida.

14.2.4. Aplicações de PHA

A aplicação mais estudada de PHA é como plástico biodegradável. A Tabela 14.3 apresenta as propriedades térmicas e mecânicas de PHA com diferentes composições.

Tabela 14.3

Propriedades térmicas e mecânicas de alguns PHA e plásticos petroquímicos

Material	Tm (ºC)	Tg (ºC)	Alongamento para ruptura (%)
P3HB	177	4	5
P3HB-*co*-10%3HV	150	-	20
P3HB-*co*-20%3HV	135	-	100
P3HB-*co*-3%4HB	166	-	45
P3HB-*co*-10%4HB	159	-	242
P3HB-*co*-10%3HHx	127	-1	400
P3HB-*co*-17%3HHx	115	0	760
PP	170	-	400
PEBD	130	-30	620
PET	262	-	730

Fonte: Pradella, (2006).

O P3HB foi o primeiro material estudado como termoplástico que poderia substituir plásticos petroquímicos em algumas aplicações. Uma das dificuldades encontradas para o processamento desse polímero é decorrente da temperatura de degradação (190°C) que é muito próxima da temperatura de fusão (aproximadamente 180°C). Assim, a janela de processabilidade é pequena e um controle preciso das temperaturas na máquina de processamento é de extrema importância. Copolímeros de 3HB e outros monômeros (3HV, 4HB, 3HHx) apresentam temperaturas de fusão menores que o P3HB, ampliando a janela de processabilidade.

O P3HB pode ser processado por injeção e moldado em peças de formas e tamanhos variáveis. A confecção de filmes por processo de extrusão por outro lado é limitada devido ao seu baixo valor do alongamento para ruptura (5% aproximadamente). A inserção de monômeros 3HV à cadeia polimérica aumenta a maleabilidade e resistência do material, permitindo atingir maiores valores de alongamento para ruptura (até 100%). Desta forma é possível aumentar o espectro de aplicações para os polímeros, mas ainda não é possível confecção de filmes plásticos por processo de extrusão. Polietileno de baixa densidade (PEBD) é o principal polímero utilizado na confecção de filmes para sacolas plásticas. Copolímeros do tipo P3HB-*co*-4HB e P3HB-*co*-3HHx apresentam propriedades que permitem seu processamento por extrusão para a produção de filmes plásticos.

Uma característica interessante dos PHA e que seus monômeros estão sempre na configuração R, ou seja, as PHA sintases apresentam uma enantiosseletividade. Desta forma, a partir de PHA é possível obter monômeros enantiopuros, isto é, contendo apenas hidroxiácidos na configuração R. Esta propriedade tem sido reconhecida como extremamente interessante para o desenvolvimento de compostos bioativos a partir dos monômeros de PHA.

Recentemente, foi demonstrado que metil-ésteres de alguns ácidos hidroxialcanóicos apresentam propriedades muito interessantes como biocombustíveis, com propriedades muito melhores que o etanol. Estas propriedades indicam uma aplicação interessante para PHA pós-uso como termoplásticos: os polímeros poderiam ser utilizados como matéria-prima para produção de biocombustíveis.

14.2.5. Impacto ambiental de PHA

PHA foram muitas vezes tratados como produtos ambientalmente amigáveis com base na visão geral de que podem ser produzidos a partir

de matérias-primas renováveis e que são biodegradáveis. Análises realizadas por engenheiros da Monsanto levaram à contestação dessa afirmação. Os autores verificaram que a quantidade de energia não renovável (fóssil) necessária no processo de produção de PHA (produção, extração e purificação) era maior que a quantidade como energia e matéria-prima para produção de polietileno e publicaram um artigo com o título "How green are green plastics?" (Gerngross e Slater, 2000). O problema apontado pelos engenheiros da Monsanto estava claramente relacionado com o cinturão verde americano e todos os processos desenvolvidos ao seu redor: totalmente movidos por energia proveniente da queima de combustíveis fósseis. Os próprios autores apontaram a solução para o problema: energia renovável.

No Brasil, foi desenvolvido processo de produção de PHA integrado a uma usina de açúcar e álcool. Este processo utiliza fonte de energia renovável (queima do bagaço de cana) e mantém este processo como realmente um ciclo verde de produção.

No início do século XXI, o cenário técnico-econômico das usinas de açúcar e álcool tem se modificado profundamente. Um desafio importante desse setor será ampliar a produção de bioetanol sem aumentos na área plantada de cana. Para atingir esse objetivo propõem-se o uso de carboidratos do bagaço ou da palha de cana para produção de etanol. Embora significativos investimentos tenham sido feitos no sentido de desenvolver linhagens de leveduras capazes de utilizar pentoses, até o momento estas são utilizadas com uma velocidade muito menor que hexoses. Uma alternativa seria utilizar as pentoses para produção de PHA.

14.2.6. Perspectivas futuras

O cenário mundial atual é realmente desafiador para o uso ampliado de bioprodutos, ou seja, produtos gerados a partir de biomassa como principal matéria-prima. Com o petróleo a US$40 o barril, a competição econômica com produtos petroquímicos é dificultada.

A diversidade biológica, por outro lado, tem mostrado que muito da capacidade de produzir polímeros ainda está por ser desvendada. A compreensão dos sistemas genéticos relacionados com a biossíntese, em conjunto com a caracterização de diferentes polímeros produzidos, ampliará ainda mais as possibilidades de desenvolver materiais feitos sob medida para diferentes aplicações. Isto será atingido com o uso de técnicas de genética combinatória, e técnicas de Engenharia de proteínas também serão muito úteis. A Engenharia de bioprocessos também proporcionará

estratégias para ampliar a diversidade de biopolímeros produzidos, além de permitir que possam ser produzidos de forma economicamente viável.

A academia (universidades e institutos de pesquisa) tem que estar preparada para desenvolver tecnologias que deverão estar disponíveis para possibilitar a redução da dependência de nossa sociedade ao petróleo. A grande questão é se somente aspectos econômicos dirigirão esta mudança na sociedade ou se aspectos ambientais também serão relevantes.

Revisão dos conceitos apresentados

Biopolímeros podem ser classificados principalmente em quatro grandes categorias: polinucleotídeos, polipeptídeos, polissacarídeos e poliésteres. Esses polímeros oferecem várias oportunidades de aplicações comercialmente relevantes.

Biopoliésteres de diferentes composições são acumulados naturalmente por bactérias como material de reserva de carbono e energia. Estes polímeros apresentam propriedades termoplásticas e podem ser utilizados como plásticos biodegradáveis. Processos de produção destes biopolímeros a partir de matérias-primas renováveis poderão representar uma alternativa aos plásticos de origem petroquímica em diferentes aplicações.

A diversidade naturalmente existente e a diversidade que será gerada com estratégias de genética combinatória, engenharia de proteínas e engenharia de bioprocessos deverão no futuro permitir o estabelecimento de biopolímeros feitos sob medida para diferentes aplicações.

Questões

1. Em um processo de produção de poli-3-hidroxibutirato (P3HB) atingiu-se cerca de 150 g/L de biomassa total contendo P3HB correspondendo a 70% da massa seca celular após 70 horas de cultivo. Qual a produtividade volumétrica (g/L.h) que foi atingida neste processo?
2. Discuta a diversidade natural de biopolímeros e a diversidade que pode ser criada artificialmente em laboratórios.

Tópicos para discussão

1. Estabelecer um debate sobre a relevância de aspectos econômicos e ambientais para decisão dos tipos de produtos que devem atender as necessidades de nossa sociedade. Os alunos podem ser convidados a defender um dos lados (econômico ou ambiental) e buscar todos os argumentos possíveis. O debate pode ser agendado para um dia específico em que cada um dos grupos deverá apresentar seu argumento e contra-argumentar a posição do outro grupo.

Sugestões para pesquisa

1. História do uso do petróleo pelo homem.
2. Biopolímeros na indústria de alimentos.
3. Desenvolvimento e uso de plásticos pelo homem.
4. Petróleo e problemas ambientais.

Referências

Anderson AJ, Dawes EA. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. *Microbiological Reviews*. 1990;54:450–472.

Atos O. System Biology of Microbial exopolysaccharides production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2015;3:200.

Becker, A. 2015. Challenges and perspectives in combinatorial assembly of novel exopolysaccharide biosynthesis pathways. Frontiers in Microbiology, vol. 6, art. 687.

Becker A, Katzen F, Pühler A, Ielpi L. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical/genetic perspective. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1998;50:145–152.

Braunegg G, Lefebvre G, Genser KF. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: physiological and engineering aspects. *Journal of Biotechnology*. 1998;65:127–161.

Chen GQ, Patel MK. Plastics derived from biological sources: present and future: A technical and environmental review. *Chemical Reviews*. 2012;112:2082–2099.

Chen GQ. A microbial polyhydroxyalkanoates (PHA) based bio- and materials industry. *Chemical Society Reviews*. 2009;38:2434–2446.

Doudna, J.A.Charpentier, E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. Science, 346: artigo 1258096.

Gao X, Chen JC, Wu Q, Chen GQ. Polyhydroxyalkanoates as source of chemicals, polymers, and biofuels. *Current Opinion in Biotechnology*. 2011;22:768–774.

Gerngross TU, Slater SC. How green are green plastics? *Scientific American, Agosto 2000*. 2000:24–29.

Gomez, J.G.C.Silva, L.F. 1998. Processo de obtenção e mutante de Burkholderia sp mais eficiente na utilização de propionato para produção de copolímero biodegradável. PI 9806557-2. Concedida em 05/11/2013.

Gomez JGC, Rodrigues MFA, Alli RCP, Torres BB, Bueno Netto CL, Oliveira MS, Silva LF. Evaluation of soil Gram-negative bacteria yielding polyhydroxyalkanoic acids from carbohydrates ande propionic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1996;45:785–791.

Kapritchkoff FM, Viotti AP, Alli RCP, Zuccolo M, Pradella JGC, Maiorano AE, Miranda EA, Bonomi A. Enzymatic recovery and purification of polyhydroxybutyrate produced by Ralstonia eutropha. *Journal of Biotechnology*. 2006;122:453–462.

Kim DY, Kim HW, Chung MG, Rhee YH. Biosynthesis, modification and biodegradation of bacterial médium-chain-length polyhydroxyalkanoates. *The Journal of Microbiology*. 2007;45:87–97.

Ledesma-Amaro R, Buey RM, Revuelta JL. Increased production of inosine and guanosine by means of metabolic engineering of the purine pathway in *Ashbya gossypii*. *Microbial Cell Factories*. 2015;14:58.

Lopes MSG. Engineering biological systems toward a sustainable bioeconomy. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 2015;42:813–838.

Madison LL, Huisman GW. Metabolic Engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 1999;63:21–53.

Matsumoto K, Taguchi S. Biosynthetic polyesters consisting of 2-hydroxyalkanoic acids: current challenges and unresolved questions. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2013;97:8011–8021.

Meng DC, Shen R, Yao H, Chen JC, Wu Q, Chen GQ. Engineering the diversity of polyesters. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014;29:24–33.

Mohite BV, Patil SV. A novel biomaterial: bacterial cellulose and its new era applications. *Biotechnology and Applied Biochemistry*. 2014;61:101–110.

Moscovici M. Present and future medical applications of microbial exopolysaccharides. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6:1012.

Nielsen TH, Nybroe O, Koch B, Hansen M, Sorensen J. Genes involved in cyclic lipopeptide production are important for seed and straw colonization by *Pseudomonas sp. Strain DSS73. Applied and Environmental Microbiology*. 2005;71:4112–4116.

Nonato RV, Mantelatto PE, Rossell CEV. Integrated production of biodegradable plastic, sugar and ethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2001;57:1–5.

Oppermann-Sanio FB, Steinbüchel A. Occurrence, functions and biosynthesis of polyamides in microorganisms and biotechnological production. *Naturwissenschaften*. 2002;89:11–22.

Pradella, J.G.C. 2006. Biopolímeros e Intermediários Químicos. Centro de Gestão e Estudos Estratégicos do Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior. Disponível em: www.redetec.org.br/wp-content/uploads/2015/02/tr06_biopolimeros.pdf.

Rossell CEV, Mantelatto PE, Agnelli JAM, Nascimento J. Sugar-based biorefinery – technology for integrated production of poly(3-hydroxybutyrate), sugar and ethanol. In: Kamn B, Gruber PR, Kamn M, eds. *2006. Biorefineries – Industrial Processes and Products. Status Quo and Future Directions*. 1Wiley-Vch Verlag GmbH & Co; 2006.

Seviour RJ, McNeil B, Fazenda ML, Harvey LM. Operating bioreactors for microbial exopolysaccharide production. *Critical Reviews in Biotechnology*. 2011;31:170–185.

Shen L, Worrell E, Patel M. Present and future development in plastics from biomass. *Biofuels, Bioproducts & Biorefining*. 2010;4:25–40.

Silva LF, Taciro MK, Raicher G, Piccoli RAM, Mendonça TT, Lopes MSG, Gomez JGC. Perspectives on the production of polyhydroxyalkanoates in biorefineries associated with the production of sugar and ethanol. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2014;71:2–7.

Silva-Queiroz SR, Silva LF, Pradella JGC, Pereira EM, Gomez JGC. PHA_{MCL} biosynthesis systems in *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas putida* strains show differences on monomer specificities. *Journal of Biotechnology*. 2009;143:111–118.

Solaiman DKY, Ashby RD, Foglia TA, Marmer WN. Conversion of agricultural feedstock and coproducts into poly(hydroxyalkanoates). *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2006;71:783–789.

Steinbüchel A. Pohydroxyalkanoic acids. In: Byrom D, ed. *Biomaterials. Novel materials from biological sources*. Basingstoke: Macmillan Publishers; 1991:123–213.

Sulaeva I, Henniges U, Rosenau T, Potthast A. Bacterial cellulose as a material for wound treatment: Properties and modification. *A review. Biotechnology Advances*. 2015;33:1547–

1571.

Wang Y, Yin J, Chen GQ. Polyhydroxyalkanoates, challenges and opportunities. *Current Opinion in Biotechnology*. 2014;30:59–65.

CAPÍTULO

15

Produção de Biossurfactante

Gizele Cardoso Fontes Sant'Ana

Kelly Alencar Silva

Maria Alice Zarur Coelho

Conceitos apresentados neste capítulo

Este capítulo trata dos biossurfactantes e inicia-se com a descrição da classificação química e apresentação dos micro-organismos produtores. Em seguida são apresentados os fatores que afetam a produção e são discutidas algumas técnicas comuns utilizadas para a sua recuperação. Na última parte do capítulo examinaremos várias possíveis aplicações industriais dos biossurfactantes.

15.1. Introdução

Os compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial ou possuem capacidade emulsificante são denominados biossurfactantes e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras.

Os biossurfactantes podem ser encontrados em superfícies de células microbianas ou secretados extracelularmente. São moléculas anfipáticas constituídas de uma porção hidrofílica e outra hidrofóbica. A porção apolar é frequentemente uma cadeia hidrocarbonada, enquanto a porção polar pode ser, por exemplo, um glicídio ou uma cadeia polipeptídica.

Em função da presença de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos na mesma molécula, os surfactantes tendem a se distribuir nas interfaces entre fases fluidas com diferentes graus de polaridade (óleo/água e água/óleo). A formação de um filme molecular, ordenado nas interfaces, reduz a tensão interfacial e superficial, sendo responsável pelas propriedades únicas dos surfactantes. Estas propriedades tornam os surfactantes adequados para uma ampla gama de aplicações industriais envolvendo: detergência, emulsificação, lubrificação, capacidade espumante, capacidade molhante, solubilização e dispersão de fases.

A grande maioria dos surfactantes atualmente utilizados nas indústrias é derivada do petróleo, entretanto esses compostos são tóxicos para o meio ambiente, não são biodegradáveis e sua acumulação se torna prejudicial ao ambiente. Portanto, o crescimento da preocupação ambiental entre os consumidores combinado com novas legislações de controle do meio ambiente levaram à procura por surfactantes naturais como alternativa aos produtos existentes. O interesse por surfactantes microbianos (biossurfactantes) nas últimas décadas vem aumentando. As indústrias estão redirecionando suas tecnologias emergentes e a biotecnologia apresenta-se como um grande desafio e com várias oportunidades de aplicação. Os biossurfactantes apresentam diversas vantagens em relação aos surfactantes sintéticos, podendo ser utilizados em uma gama de aplicações industriais. Entretanto os biossurfactantes ainda não são amplamente utilizados devido aos altos custos de produção, associados aos métodos ineficientes de recuperação do produto e o uso de substratos caros, não sendo por enquanto capazes de competir economicamente com os surfactantes químicos.

A maioria dos biossurfactantes microbianos relatados na literatura é de origem bacteriana. Bactérias produtoras de surfactantes incluem:

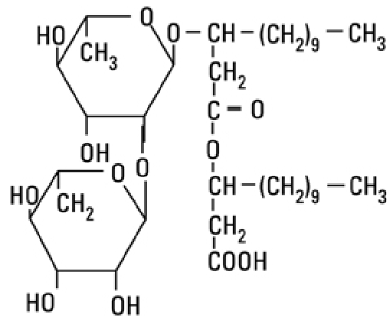
Pseudomonas aeruginosa (mono-di-ramnolipídeos), *Corynebacterium, Nocardia* e *Rhodococcus* (fosfolipídeos glicolipídeos, etc.) *Bacillus subtilis* (surfactina), *Bacillus licheniformis* (lipopeptídeos) e *Arthrobacter paraffineus* (trealose e lipideos sucrose). Fungos envolvidos na produção de surfactantes incluem as leveduras *Torulopsis sp* (soforolipídeos) e *Candida sp* (liposan e fosfolipídeos).

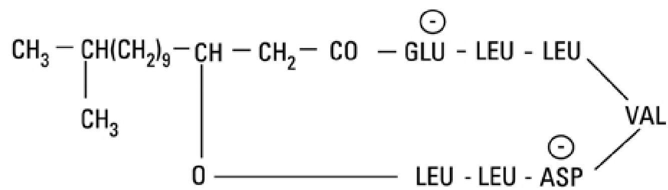
Alguns micro-organismos podem produzir biossurfactantes quando crescem em diferentes substratos, variando desde carboidratos até hidrocarbonetos. O uso de diferentes fontes de carbono altera a estrutura dos biossurfactantes produzidos e, consequentemente, suas propriedades emulsificantes. Estas mudanças podem ser benéficas quando se desejam propriedades específicas para uma aplicação direcionada. Diversos são os estudos realizados por vários autores na produção de biossurfactantes envolvendo propriedades físico-químicas

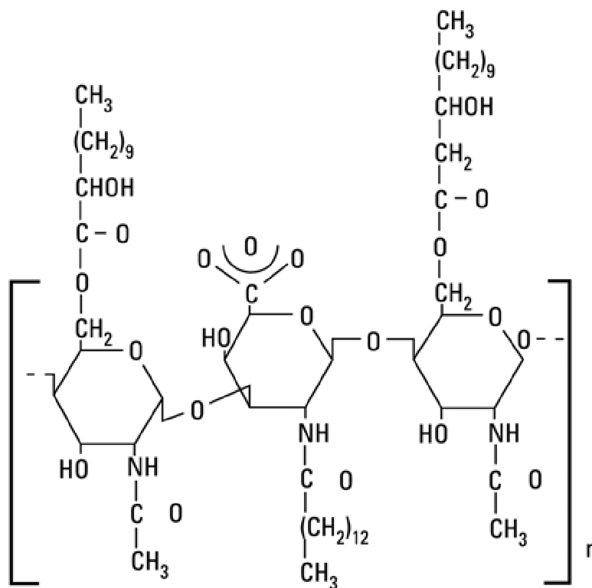
15.2. Classificação química dos biossurfactantes

Os biossurfactantes estruturalmente apresentam combinações diversas, principalmente aqueles produzidos por micro-organismos na presença de hidrocarbonetos.

As moléculas de biossurfactantes apresentam uma parte hidrofóbica composta por longas cadeias de ácido graxos, hidroxi ou alquil β - hidroxi de ácidos graxos enquanto que a parte hidrofílica pode ser composta de carboidratos, aminoácidos, peptídeos cíclicos, fosfatos, ácidos carboxílicos ou álcoois. Dentre os biossurfactantes mais conhecidos, podemos destacar os glicolipídeos (ramnolipídeo), lipopeptídios (surfactina), fosfolipídeos (fosfatidiletanolamina), complexos de proteínas e polissacarídios, ácidos graxos, lipídios neutros, surfactantes poliméricos (emulsan) e surfactantes particulados. A Figura 15.1 mostra alguns tipos de biossurfactantes produzidos por diferentes micro-organismos.







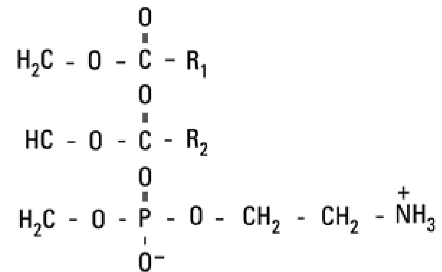


FIGURA 15.1 Estrutura química de alguns tipos de biossurfactante. *Fonte*: Desai e Banat (1997).

Os glicolipídeos são os biossurfactantes mais conhecidos e estudados, sendo considerados de baixo peso molecular. A sua estrutura é formada por combinação de carboidratos e uma longa cadeia de ácidos alifáticos. Os ramnolipídeos são os glicolipídeos mais bem estudados, sendo produzidos principalmente por *Pseudomonas aeruginosa*. Sua estrutura contém uma ou duas moléculas de ramnose que são ligadas a uma ou duas moléculas de ácido β - hidroxidecanóico.

Os biossurfactantes poliméricos possuem alto peso molecular, apresentam alta viscosidade e resistência ao cisalhamento, sendo formados por complexos de polissacarídeos ligados à cadeia hidrocarbônica.

Os lipopeptídeos e lipoproteínas são uma classe de biossurfactantes que inclui uma cadeia de aminoácidos na parte hidrofílica ligada a uma cadeia de ácido graxo. O lipopeptídeo mais conhecido é a surfactina, produzida pelo micro-organismo *Bacillus subtilis*.

15.3. Micro-organismos produtores de biossurfactante

Vários micro-organismos possuem a capacidade de produzir moléculas com atividade interfacial. Nas últimas décadas tem aumentado o interesse em identificar e isolar novos micro-organismos produtores de moléculas tenso-ativas que apresentem boas características de surfactante, como baixa CMC (concentração micelar crítica), baixa toxicidade, alta atividade de emulsificação, dentre outros.

A maioria dos surfactantes microbianos relatados na literatura são de origem bacteriana como os produzidos por *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.*, *Bacillus sp.*, *Arthrobacter sp.* Entretanto, a grande maioria dos biossurfactantes de origem bacteriana não é adequada para utilização na indústria alimentícia, devido a sua natureza patogênica.

As leveduras também têm sido estudadas para a produção de emulsificadores. Entre as leveduras, espécies de *Candida* (*Yarrowia*) têm sido largamente estudadas e empregadas com sucesso na produção de biossurfactanes.

Uma grande vantagem do uso de leveduras é que muitas delas, como *Yarrowia lipolytica, Saccharomyces cerevisiae e Kluyveromyces lactis*, apresentam status GRAS (Generally Regarded As Safe). Organismos com status GRAS não apresentam riscos de toxicidade e patogenicidade, o que permite sua utilização para aplicações na indústria alimentícia e farmacêutica.

Os micro-organismos produtores de biossurfactantes mais conhecidos estão listados na Tabela 15.1.

Tabela 15.1

Principais classes de biossurfactantes e micro-organismos envolvidos

Tipo de biossurfactante	Micro-organismo
Glicolipídios	
- ramnolipídios	*Pseudomonas aeruginosas*
- soforolipídios	*Torulopsis bombicola, T. apicola*
- Trealolipídios	*Rhodococcus erythropolis, Mycobacterium sp.*
Lipopeptídios e lipoproteínas	
- Peptídio-lipídio	*Bacillus licheniformis*
- Viscosina	*Pseudomonas fluorescens*
- Serrawetina	*Serratia marcescens*
- Surfactina	*Bacillus subtilis*
- Subtilisina	*Bacillus subtilis*
- Gramicidina	*Bacillus brevis*
- Polimixina	*Bacillus polymyxa*
Ácidos graxos, lipídios neutros e fosfolipídios	
- Ácidos graxos	*Corynebacterium lepus*
- Lipídios neutros	*Nocardia erythropolis*
- Fosfolipídios	*Thiobacillus thiooxidans*
Surfactantes poliméricos	
- emulsan	*Acinetobacter calcoaceticus*
- biodispersan	*Acinetobacter calcoaceticus*
- liposan	*Candida lipolytica*
- carboidrato-lipídio-proteína	*Pseudomonas fluorescens*
- manana-lipídio-proteína	*Candida tropicalis*
Surfactantes particulados	
- vesículas	*Acinetobacter calcoaceticus*
- células	Várias bactérias

Fonte: Nitschke e Pastore (2002).

As principais funções fisiológicas do biossurfactante incluem:

1. aderência-liberação da célula a superfícies: uma das mais importantes estratégias de sobrevivência dos micro-organismos é sua habilidade em colonizar um nicho ecológico onde possa se multiplicar. O elemento chave nesta estratégia são estruturas da superfície celular responsáveis pela aderência das células às superfícies. Os micro-organismos podem utilizar surfactantes ligados à parede para regular as propriedades da superfície celular, visando aderir ou se desligar

de um determinado local de acordo com sua necessidade para encontrar novos habitats com maior disponibilidade de nutrientes ou se livrar de ambientes desfavoráveis;

2. atividade antibiótica: demonstrada por vários biossurfactantes, principalmente da classe dos lipopeptídios e glicopeptídios;
3. transporte de hidrocarbonetos: um aumento significativo da porção lipídica do polissacarídeo de membrana, quando o micro-organismo cresce em alcanos, indica que o complexo polissacarídeo-ácido-graxo (biossurfactante) presente na superfície celular estaria envolvido no transporte de hidrocarbonetos; e
4. emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos ou compostos insolúveis em água: facilitando o crescimento de micro-organismos nestes substratos.

15.4. Fatores que afetam a produção de biossurfactante

A composição e as características dos biossurfactantes produzidos por micro-organismos são influenciadas pela natureza das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas, assim como pela presença de fósforo, ferro, manganês e magnésio no meio de produção. Além disso, outros fatores, como pH, temperatura, agitação e forma de condução do processo são extremamente importantes na quantidade e na qualidade do biossurfactante produzido. Para obtenção de grande quantidade de biossurfactante é de fundamental importância o estudo dos requerimentos nutricionais e das condições do processo.

A produção de biossurfactante pode ser espontânea ou induzida pela presença de compostos lipofílicos, por variações de pH, temperatura, aeração e velocidade de agitação ou, ainda, quando o crescimento celular é mantido sob condições de estresse, como baixas concentrações da fonte de nitrogênio. A Tabela 15.2 apresenta diferentes possibilidades de produção de biossurfactantes.

Tabela 15.2

Diferentes formas de produção de biossurfactante

Produção de biossurfactante associado ao crescimento celular
Indução da produção por substratos lipofílicos
Aumento da produção pela otimização da composição do meio
Aumento da produção por otimização das condições de pH, aeração, velocidade de agitação, etc.
Aumento da produção por adição de reagentes, o qual causa uma mudança na permeabilidade da parede celular, como penicilina e EDTA
Produção de biossurfactante por crescimento celular em condições limitantes
Condições limitantes de nitrogênio
Condições limitantes de cátions multivalentes
Condições limitantes por mudanças no ambiente do meio, como pH e temperatura
Produção de biossurfactante por "resting cell"
Produção por células livres
Produção por células imobilizadas
Produção por células imobilizadas com remoção simultânea do produto
Produção de biossurfactante por crescimento associado e "resting cells" com adição de precursores

Fonte: Syldatk e Wagner (1987).

A produção de biossurfactantes por *resting cells* é uma forma de produção em que não há multiplicação celular. Contudo, as células continuam a utilizar a fonte de carbono para produção do biossurfactante.

15.4.1. A fonte de carbono

A influência da fonte de carbono na produção de biossurfactante por diferentes cepas de micro-organismos tem sido bastante estudada. A literatura aponta uma ampla diversidade entre as fontes de carbono. Pareilleux (1979) isolou compostos tenso-ativos a partir da levedura *Candida lipolytica* em meio contendo n-alcanos como fonte de carbono, mas quando foi cultivada em meio contendo glicose a levedura não produziu nenhum bioemulsificante. Em um estudo similar, Zinjarde e Pant (2002) mostraram que a biossíntese de surfactante por *Y. lipolytica* NCIM 3589 utilizando como fonte de carbono substratos solúveis (glicose, glicerol, acetato de sódio e álcool) não é viabilizada. Entretanto, em meio contendo óleo cru e alcanos (C10 – C18) detectou-se a produção de bioemulsificante.

Em 2001, Sarubbo *et al.* produziram biossurfactante utilizando glicose como fonte de carbono a partir da levedura *C. lipolytica IA* 1055, a qual apresentou uma alta atividade de emulsificação. Esses autores mostraram que não é necessária a presença de hidrocarbonetos para indução da biossíntese de surfactantes.

Apesar da produção de biossurfactantes ocorrer na presença de fontes de carbonos solúveis em água, como os açúcares, vários estudos mostram que as maiores produções de biossurfactantes são obtidas quando substratos hidrofóbicos são adicionados.

Os substratos hidrofílicos são utilizados primeiramente pelo micro-organismo para o metabolismo celular e para a síntese da porção polar da molécula de biossurfactante, enquanto que os substratos hidrofóbicos são utilizados exclusivamente para a produção da porção hidrocarbônica do biossurfactante.

As vias metabólicas envolvidas na síntese de precursores para produção de biossurfactante são diversas e dependem da natureza da principal fonte de carbono utilizada no meio de cultivo. Por exemplo, quando se utiliza carboidratos como única fonte de carbono no meio de cultivo para a produção de glicolipídeo, o fluxo de carbono é regulado de tal forma que ambas as vias lipogênicas (formação de lipídeos) e de formação da porção hidrofílica (através da via glicolítica) são especialmente supridas pelo metabolismo microbiano, como mostra a Figura 15.2.

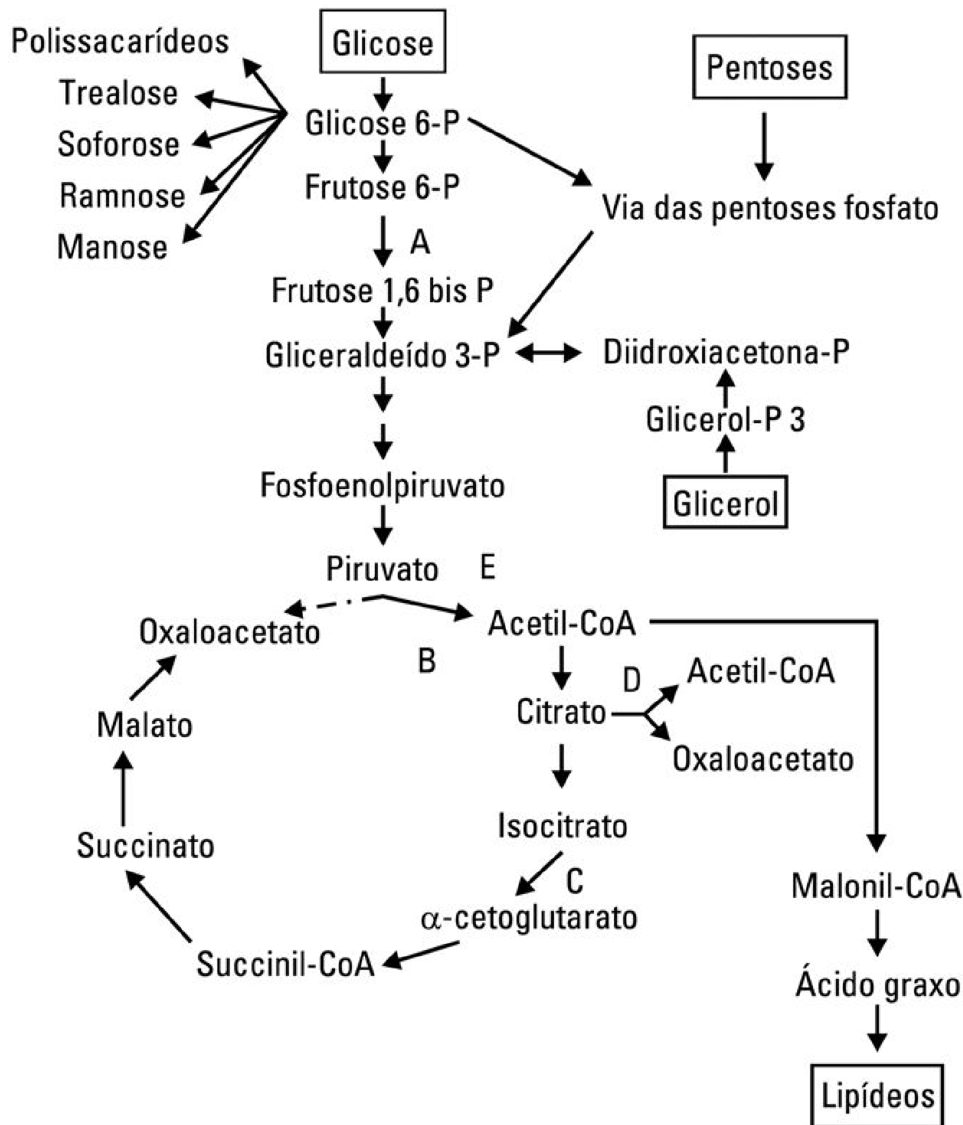


FIGURA 15.2 **Metabolismo intermediário relacionado com a síntese de precursores de biossurfactante a partir da utilização de carboidratos como substratos. Enzimas chaves para o controle do fluxo de carbono: A. fosfofrutoquinase; B. Piruvato quinase; C. isocitrato desidrogenase; D. citrato liase (presentes apenas em leveduras oleaginosas e fungos); e E. piruvato desidrogenase.** *Fonte*: Fontes *et al.* (2008).

O substrato hidrofílico utilizado, como, por exemplo, glicose, glicerol ou outros, é degradado até formar intermediários da via glicolítica, como a glicose 6-fosfato, que é um dos principais precursores dos carboidratos presentes na porção hidrofílica do biossurfactante (Figura 15.2). Para a produção de lipídeos a glicose é oxidada a piruvato por meio da glicólise, sendo o piruvato então convertido a acetil-CoA, que unida ao oxaloacetato

produz malonil-CoA e, em seguida, ácido graxo, um dos precursores para a síntese de lipídeos.

Por outro lado, quando um hidrocarboneto é utilizado como fonte de carbono, o metabolismo microbiano se dirige principalmente à via lipolítica e à gliconeogênese (formação de glicose a partir de precursores diferentes das hexoses) podendo, desta forma, ser utilizado para produzir ácidos graxos ou sacarídeos. Para a produção dos sacarídeos a via da gliconeogênese é ativada. Consiste na oxidação dos ácidos graxos via β-oxidação a acetil-CoA (ou propionil-CoA, no caso de ácidos graxos de cadeia ímpar). A partir da formação do acetil-CoA, as reações envolvidas na síntese dos precursores do polissacarídeo, tal como glicose 6-fosfato, são essencialmente o inverso daquelas envolvidas na glicólise. Entretanto, as reações catalisadas pela piruvato quinase e fosfofrutoquinase-1 são irreversíveis; desta forma, outras enzimas, as quais são exclusivas para gliconeogênese, são requeridas para contornar tais reações. As principais reações são apresentadas na Figura 15.3, até a formação da glicose 6-fosfato que é a principal precursora dos polissacarídeos, dissacarídeos a serem formados para produção da porção hidrofílica dos glicolipídeos.

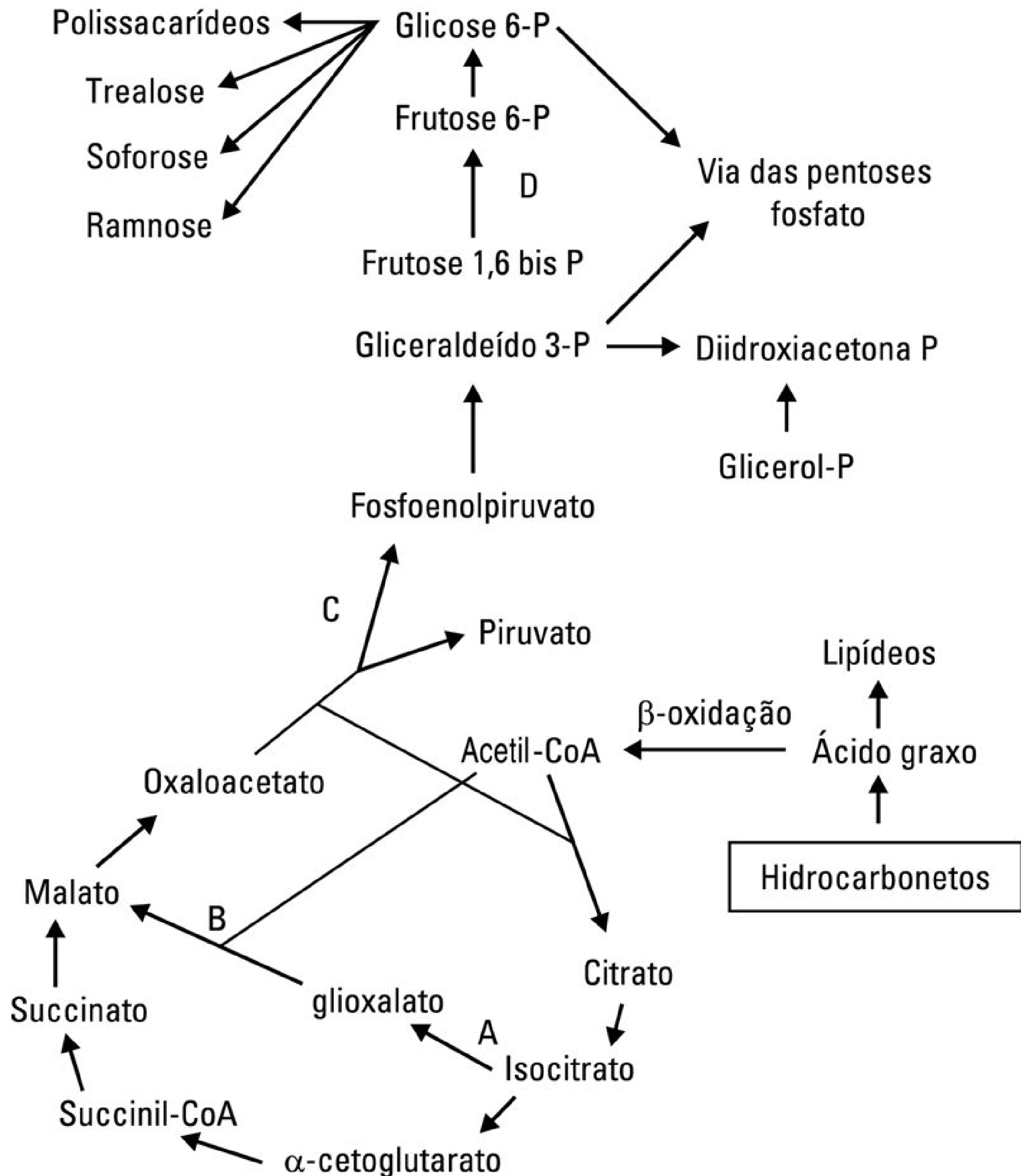


FIGURA 15.3 Metabolismo intermediário relacionado com a síntese de precursores de biossurfactante a partir da utilização de hidrocarbonetos como substratos. As enzimas chaves são: A. isocitrato liase; B. malato sintase; C. fosfoenolpiruvato carboxilase; e D. frutose – 1,6 bifosfatase. *Fonte*: Fontes *et al.* (2008).

A biossíntese do emulsificante pode acontecer seguindo quatro caminhos diferentes: síntese do carboidrato e do lipídeo; síntese da metade de carboidrato, enquanto que a síntese da metade lipídica dependerá do

comprimento da cadeia do substrato carbônico presente no meio; síntese da metade lipídica, enquanto que a síntese da metade de carboidrato dependerá do substrato utilizado; síntese das metades carboidrato e lipídica, dependendo do substrato.

Portanto, um fator que altera a biossíntese do surfactante é o comprimento da cadeia do n-alcano utilizado como fonte de carbono. Kitamoto *et al.* (2001) estudaram a produção de lipídeos de manosileritritol (Mel) pela levedura *Candida antarctica* frente a diferentes n-alcanos. Observou-se que essa espécie não cresce e nem produz biossurfactante em meio contendo n-alcanos de C10 a C18. Entretanto, quando cultivada em meio contendo n-alcanos de C12 a C18 houve produção, sendo que o octadecano foi o substrato que promoveu maior rendimento. Já em meio contendo n-alcanos com números de carbono maiores que 19 a produção foi mínima.

Cavalero e Cooper (2003) também mostraram que o rendimento da produção de biossurfactante cresce com o aumento do comprimento da cadeia do n–alcano utilizado (C12 para C15).

15.4.2. Fonte de nitrogênio

No meio de produção de biossurfactantes o nitrogênio é essencial para o crescimento celular, sendo de grande importância para a síntese de proteínas e enzimas. Diferentes compostos nitrogenados têm sido empregados na produção de biossurfactantes, tais como licor de milho, milhocina, ureia, peptona, extrato de levedura, sulfato de amônio, nitrato de amônio, nitrato de sódio, dentre outros como extrato de carne, farelo de soja e extrato de malte. O extrato de levedura é a fonte de nitrogênio mais utilizada para a produção de biossurfactantes, mas sua concentração varia de acordo com o micro-organismo e o meio de produção.

Casas e Ochoa (1999), para otimizar o meio de produção, testaram diferentes concentrações de extrato de levedura (1 a 20 g/L) e observaram que em baixas concentrações de extrato de levedura (1 g/L) a produção de soforolipídeos produzidos por *Candida bombicola* é favorecida. Segundo os autores, em altas concentrações de extrato de levedura, a produção de biossurfactante diminui devido à exaustão da fonte de carbono, causada pelo grande crescimento da biomassa.

A produção de biossurfactante ocorre principalmente quando a fonte de nitrogênio está esgotada, durante a fase estacionária do crescimento da biomassa. A Figura 15.4 apresenta o crescimento celular da levedura *C. antartica* em batelada, em meio contendo íon amônio (10 g/L) e peptona (1

g/L) como fontes de nitrogênio. Observa-se que a produção do glicolipídeo ocorre quando há o esgotamento da fonte de nitrogênio (entre 50 e 200 h), atingindo um valor de 38 g/L após 200 h de fermentação (Kim *et al.*, 2006).

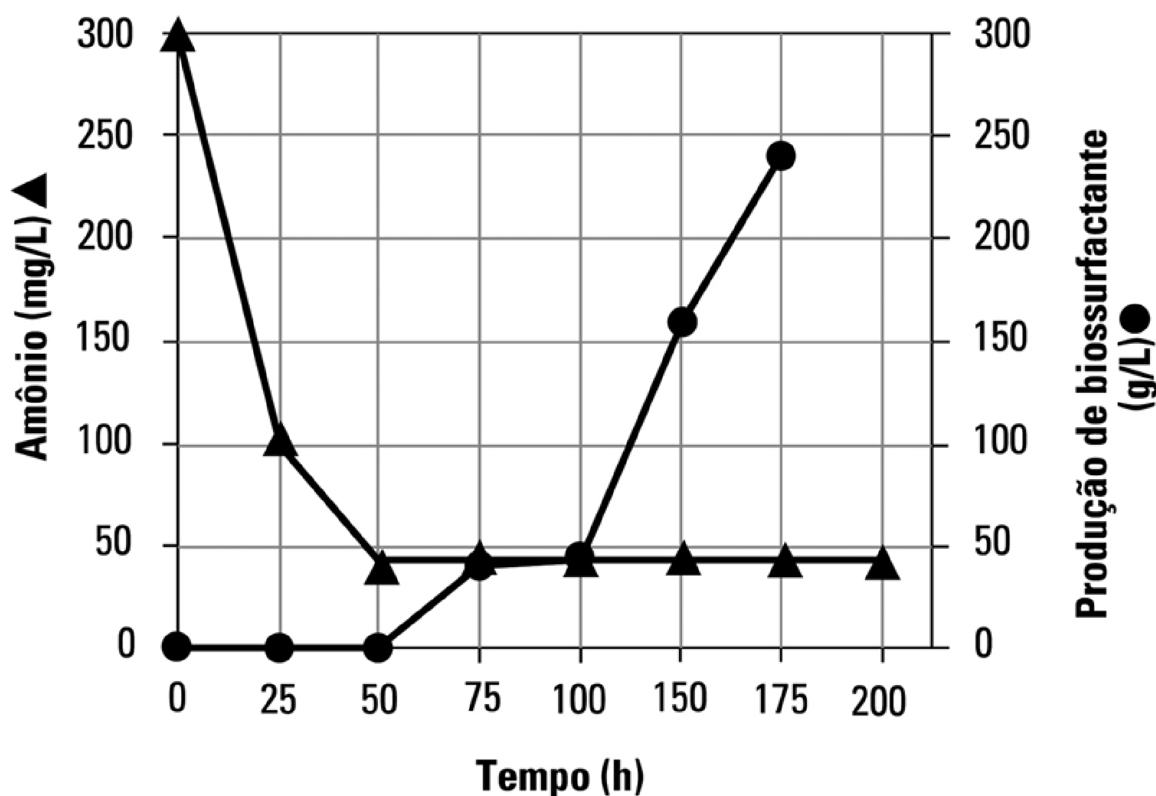


FIGURA 15.4 Cultivo de *Candida antarctica*, mostrando o consumo de nitrogênio (amônio) e o início da produção do biossurfactante MEL-SY16. *Fonte*: Adaptado de Kim *et al.* (2006).

Albrecht *et al.* (1996) sugeriram um mecanismo pelo qual a síntese de biossurfactante acontece em condições limitantes de nitrogênio. Segundo os autores, esta condição causa um declínio na atividade específica da isocitrato desidrogenase (dependente de NAD^+ e $NADP^+$), enzima responsável pela oxidação do isocitrato a α-cetoglutarato no ciclo do ácido cítrico. Como o declínio da atividade leva a um acúmulo de isocitrato e subsequentemente citrato na mitocôndria, ambos são transportados para dentro do citosol, onde o citrato é clivado pela citrato sintase, originando acetil-coA, que é a precursora da síntese de ácido graxo, aumentando, dessa forma, a produção de biossurfactante.

15.4.3. Forma de condução do processo

Após a otimização do meio de cultivo, diferentes formas de condução de processos para obtenção de biossurfactantes têm sido descritas na literatura, de maneira a incrementar a produção desses.

De forma geral, um processo pode ser operado das seguintes formas: descontínuo/batelada simples (com um inóculo por tanque; com recirculação de células); semicontínuo (com ou sem recirculação de células); descontínuo alimentado/batelada alimentada (com ou sem recirculação de células); contínuo conduzido em um ou em vários reatores (com ou sem recirculação de células).

Entre as opções supracitadas, as fermentações por batelada simples e batelada alimentada são as mais utilizadas para estudos de produção de biossurfactante.

Os cultivos por batelada e batelada alimentada são modos de condução de bioprocessos, cujas características tornam suas aplicações atrativas para uma grande gama de processos fermentativos, por exigirem menos em termos de equipamentos, acompanhamento e manutenção. São também mais seguros em relação ao problema da manutenção das condições de assepsia, pois ao final de cada batelada o reator é esterilizado juntamente com o novo meio de cultura, recebendo um novo inóculo, com todos os controles necessários, a fim de assegurar a presença única do micro-organismo responsável pelo processo.

No decorrer do processo por batelada simples nada é adicionado, exceto oxigênio no caso de processos aeróbicos, antiespumante e ácido ou base para controle do pH. Entretanto, durante a batelada alimentada os nutrientes, ou parte deles, são adicionados ao biorreator por uma corrente de alimentação que, por não existir descarga, provoca um contínuo incremento do volume ocupado no reator. Normalmente, esta forma de condução de bioprocessos é utilizada em sistemas nos quais o agente microbiano seja fortemente sensível a fenômenos de inibição por substrato, ou repressão catabólica, tipicamente manifestados em sistemas que apresentem cinética de formação de produto não associado ao crescimento.

Resultados bastante promissores vêm sendo publicados baseados no uso de batelada alimentada para a produção de biossurfactante. A produção de lipídeos de manosileritritol por *C. antarctica* foi de 95 g/L após 200 h de fermentação por batelada alimentada, utilizando glicose e óleo de soja como fonte de carbono. O rendimento foi 2,6 vezes maior que o rendimento obtido na produção deste por batelada simples (37g/L) (Kim *et al.*, 2006).

Rau *et al.* (2005) produziram biossurfactante por *Pseudozyma aphidis* utilizando óleo de soja e glicose, em batelada alimentada, obtendo uma alta produção de biossurfactante (168 g/L) ao final de 11 dias de fermentação.

Deste modo, a escolha adequada da forma de condução do processo é um passo importante, uma vez que pode alterar a produtividade do produto desejado.

15.5. Recuperação de biossurfactantes

A escolha dos processos de recuperação dos biossurfactantes mais adequados depende, dentre outras coisas, da carga iônica, da solubilidade em água e da localização da síntese do biossurfactante (intracelular ou extracelular). Estes processos bem como a concentração do biossurfactante são decisivos na determinação do custo da produção do biossurfactante, sendo de primordial interesse industrial. As indústrias têm investido no estudo de diferentes métodos de extração do biossurfactante e otimização de processos, buscando principalmente eficiência e baixo custo.

A etapa de isolamento do biossurfactante na maioria das vezes representa custos consideráveis para sua produção. Existem métodos de isolamento de remoção que podem ser contínuos ou descontínuos ao processo de fermentação. Os mais estudados e utilizados são os métodos descontínuos entre os quais se destaca a extração com solventes, como clorofórmio-metanol, acetato de etila e tetrahidrofurano. Na Tabela 15.3 são mostrados alguns dos processos mais abordados na literatura.

Tabela 15.3

Tipos de processos utilizados para a extração de biossurfactante

Tipos de processos	Tipos de biossurfactantes
Precipitação por sulfato de amônio	Emulsão, bioemulsificante
Precipitação por acetona	Bioemulsificante
Precipitação ácida	Surfactina e lichenysin
Extração por solvente orgânico	Trealolipídios, soforolipídios
Cristalização	Glicolipídios
Centrifugação	Glicolipídios
Adsorção	Ramnolipidios e glicolipideos
Fracionamento por espuma	Surfactina
Filtração por fluxo tangencial	Mistura de biossurfactantes
Diafiltração e preciptação	Glicoplipidios
Ultrafiltração por membrana	Glicolipidios e surfactina

15.5.1. Precipitação por sulfato de amônio

A extração por precipitação com sulfato de amônio com posterior diálise é um método eficiente, além de demonstrar ser mais viável em termos de

custos e eficiência, pois é capaz de remover a maior quantidade de impurezas presentes no meio de produção do biossurfactante. A seleção desse método de separação está baseada na exclusão da fase saturada em sal (sulfato de amônio) pelo biossurfactante polimérico que é rico em proteínas. Esse processo é denominado *salting-out*.

O processo de *salting out* é um mecanismo de precipitação de proteínas com sais que decorre de um aumento da força iônica do sistema. Sabe-se que quando pequenas quantidades de sal (como o sulfato de amônio) são adicionadas à solução contendo proteínas, ocorre interação destas com cargas provenientes da dissociação do sal e diminuição da interação interproteínas, aumentando a solubilidade do meio aquoso. Entretanto, em condições de elevada força iônica, verifica-se o efeito oposto. Isto é, as moléculas de água interagem mais fortemente com os íons provenientes da dissociação do sal, promovendo a desidratação das proteínas. Durante esse processo, a interação interproteínas se torna mais forte, diminuindo a solubilidade das mesmas em meio aquoso e assim a ocorrência de precipitação das proteínas.

A precipitação de biossurfactantes com sulfato de amônio é um método simples que não requer o uso de equipamentos, além de ser efetiva no isolamento de alguns tipos de biossurfactantes poliméricos. Geralmente, essa técnica é realizada pela adição de sulfato de amônio ao sobrenadante em quantidades que atinjam 70% de saturação. Posteriormente o material é deixado em repouso por algumas horas sob temperatura de refrigeração e logo após são centrifugadas e dializadas com água deionizada e trocas regulares dessa água para remoção do sal aderido ao biossurfactante.

Ao final de 24 horas de diálise, o líquido é recolhido e liofilizado. Na Figura 15.5 pode ser visualizado um exemplo de aparato experimental da etapa de diálise após precipitação por sulfato de amônio.

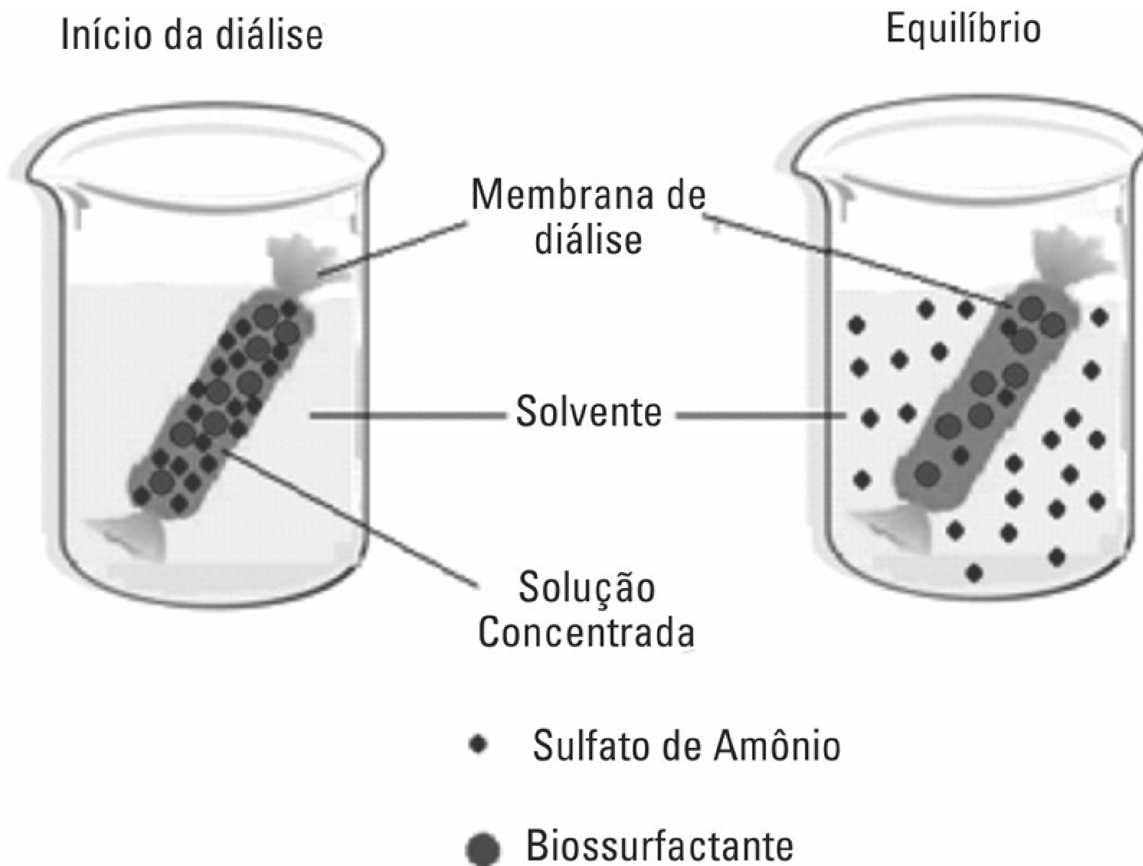


FIGURA 15.5 Aparato experimental de diálise utilizado para solução precipitada por sulfato de amônio. *Fonte*: Adaptado de Lopes (2015).

A diálise é uma técnica simples de purificação e está baseada no tamanho da partícula. Nessa técnica se utiliza uma membrana semipermeável para reter moléculas proteicas permitindo a passagem das moléculas menores do soluto e da água. No mercado há membranas para massas molares que variam de 1000 Da até 30 kDa ou mais. A diálise é usada frequentemente após a etapa de precipitação com sulfato de amônio.

15.5.2. Precipitação ácida

Outro processo de recuperação de biossurfactante é por precipitação ácida. Alguns biossurfactantes podem ser obtidos devido a sua insolubilidade em baixo pH. Esse tipo de metodologia não requer muitos equipamentos, e dentre as vantagens de sua utilização podem ser citados o baixo custo e a boa eficiência na recuperação do surfactante bruto. Como exemplo, pode-se citar a surfactina e outros biossurfactantes produzidos por *Bacillus* que

são facilmente extraídos por precipitação ácida, ajustando-se ao pH do meio para o ponto isoelétrico do composto desejado. Posteriormente o composto pode ser obtido por extração líquido-líquido ou extração sólido-líquido.

15.5.3. Extração por solvente orgânico

A extração de biossurfactantes pelo uso de solventes orgânicos também mostra ser eficiente. Dentre os solventes mais utilizados pode-se citar o éter etílico, clorofórmio, etanol, metanol, acetona, entre outros. Muitos biossurfactantes são solúveis nesses meios devido à presença de cadeia hidrofóbica. Esse tipo de procedimento também não requer uso de equipamentos aprimorados e possui como vantagens a eficiência na recuperação do surfactante bruto, a purificação parcial, bem como sua natureza reutilizável. A mistura mais efetiva na extração de biossurfactante tem sido o clorofórmio e metanol, pois esses reagentes facilitam no ajuste de polaridade da molécula que se pretende extrair. Contudo, o uso destas substâncias em grande escala demanda grandes volumes tornando o processo caro, além de gerar resíduos.

15.5.4. Adsorção em carbono ativo

Na metodologia de extração por adsorção de carbono ativo, os biossurfactantes são adsorvidos em carvão ativo e podem ser dessorvidos com o uso de solvente orgânico. Para isso, não é necessário o uso de equipamentos, pode ser adicionado ao meio de cultivo e também pode ser empregado em colunas de vidro. Sua vantagem está em proporcionar um biossurfactante com elevada pureza, ter baixo custo, ser reutilizável e poder ser utilizada para recuperação de biossurfactantes em cultura contínua. Essa técnica já foi utilizada em alguns estudos como para a recuperação de biossurfactante produzido por *Pseudomonas aeruginosa* de resíduos de fermentados em destilaria, no qual a eficiência de adsorção atingiu 99,5%. Segundo os autores, esse processo reduz o alto custo dos solventes e minimiza a degradação do produto.

15.5.5. Fracionamento por espuma

A técnica de fracionamento por espuma também pode ser utilizada, já que biossurfactantes, devido à sua atividade surfactante, são capazes de se formar e particionar na espuma durante a fermentação. Para o fracionamento por espuma é necessário a construção de biorreatores

especiais que facilitem a recuperação da espuma durante a fermentação. Essa metodologia geralmente é utilizada em processos contínuos de recuperação, além disso, é uma metodologia capaz de proporcionar um produto de alta pureza.

O fracionamento por espuma consiste na injeção de gás pela base da coluna de líquido através de placas de vidro (perfuradas ou sinterizadas), que proporciona o borbulhamento de gás na solução. Nessa solução encontra-se o biossurfactante a ser separado ou concentrado. As bolhas formadas pela injeção de gás possibilitam o surgimento de grande área superficial, favorecendo a adsorção das moléculas tensoativas na interface gás-líquido. Com isso, à medida que as bolhas de gás ascendem pela solução, ocorre a concentração das moléculas na interface gás-líquido, que são transportadas para a fase espuma que se formará quando as bolhas enriquecidas nelas deixam a fase aquosa.

O uso de colunas para a fase espuma permite que a espuma se eleve axialmente, ocorrendo a drenagem de uma porção do líquido transportado da fase líquida, isso proporciona a concentração do soluto com atividade de superfície ao longo da coluna e a solução concentrada, obtida pela remoção e colapso da espuma no topo da coluna, sendo coletada como produto. Dentre as vantagens desse sistema de extração está a recuperação primária em processos contínuos e de batelada e a não utilização de solventes ou equipamentos de grande porte.

15.5.6. Filtração por fluxo tangencial

A filtração por fluxo tangencial é uma metodologia que pode ser recomendada para produção em larga escala de biossurfactantes e consiste na concentração de produto presente na solução da alimentação de uma etapa precedente de purificação ou de separação. A solução é circulada em ciclo fechado, passando através do filtro (Figura 15.6). Nesse processo, a medição em tempo real permite a determinação exata do ponto de corte da concentração e desta maneira é possível aumentar o lucro.

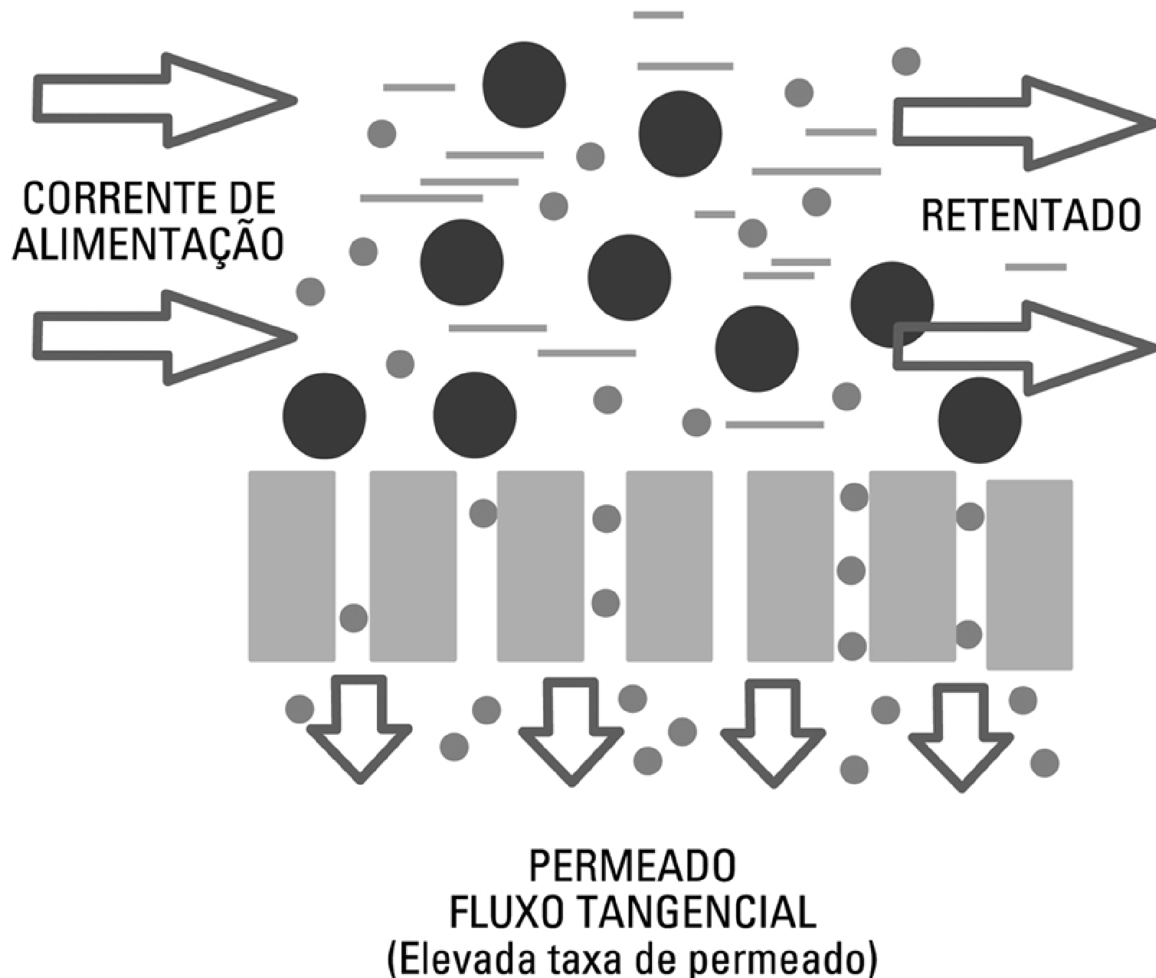


FIGURA 15.6 Esquema ilustrativo do tipo de filtração tangencial. *Fonte*: Adaptado de Spectrum Laboratories (2015) e Albani (2008).

15.5.7. Diafiltração e Precipitação

Outro processo que pode ser citado é a diafiltração. Este processo utiliza filtros seletivos que permitem a passagem de partículas de baixo peso molecular e ao mesmo tempo proporcionam a retenção de moléculas maiores. Assim, por meio da remoção dos produtos e sua substituição pelo mesmo volume de água deionizada ou tampão, o produto é retido e purificado. Como o volume permanece constante a concentração do produto de interesse permanece constante também.

A diafiltração pode ser realizada de forma contínua ou descontínua, revelando características peculiares a cada procedimento quanto ao diavolume usado versus o tempo necessário ao procedimento, podendo este variar, como no caso do estudo da remoção de lactose em sistema específico para purificação de proteína, de 1 a 5 diavolumes.

15.5.8. Microfiltração e Ultrafiltração por membrana

Os processos de separação por membranas têm se mostrado eficientes para recuperação e concentração dos biossurfactantes. A microfiltração pode ser utilizada para a recuperação dos biossurfactantes oriundos do meio fermentativo, ou da espuma de fermentação, pois são capazes de separar componentes celulares e células inteiras evitando com isso um crescimento indesejável pós-biorreação.

Outro processo de separação por membranas é a ultrafiltração que, além de permitir recuperar, também concentra e purifica parcialmente os biossurfactantes. Isso é possível devido à capacidade de os biossurfactantes formarem micelas após determinada concentração, o que é chamado de concentração micelar crítica.

O que diferencia a microfiltração da ultrafiltração é o diâmetro dos poros das membranas que as compõem. A União Internacional de Química Pura e Aplicada (IUPAC) por volta de 1985 estabeleceu critérios para a classificação das membranas porosas. As membranas porosas utilizadas para microfiltração são capazes de separar sólidos com diâmetro de 50 nm e aquelas utilizadas para a ultrafiltração conseguem separar partículas entre 2 e 50 nm.

Quando o biossurfactante atinge a concentração micelar crítica, eles são capazes de formar agregados estáveis que variam de tamanho de acordo com o biossurfactante. Em estudos com surfactinas, por exemplo, esses agregados podem conter de 50 a 100 moléculas, atingindo tamanho suficientemente grande para que possam ser separados por ultrafiltração. Essa metodologia possui como vantagens: rapidez, recuperação de biossurfactante em apenas uma etapa e alto grau de pureza e reutilização das membranas. No entanto, isso só é possível caso os princípios de limpeza e conservação da membrana sejam realizados.

A Figura 15.7 mostra o esquema de ultrafiltração, no qual as moléculas menores passam retendo apenas partículas maiores do diâmetro do poro da membrana.

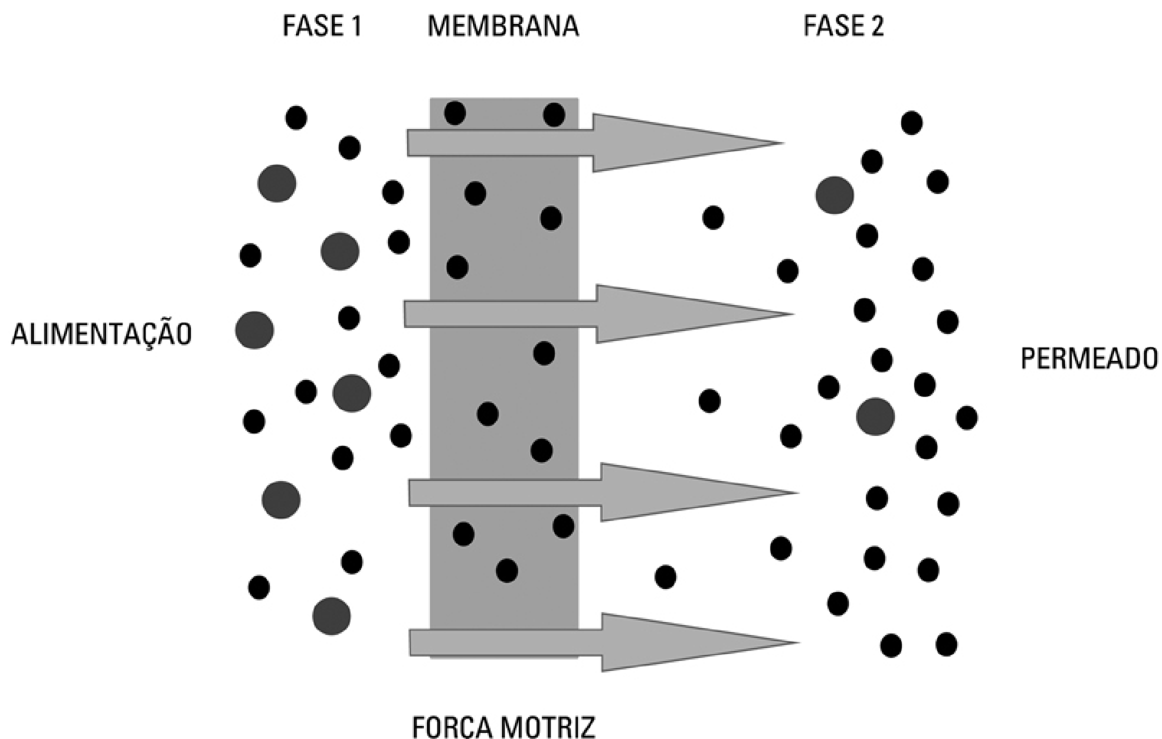


FIGURA 15.7 Esquema ilustrativo de ultrafiltração por membrana. *Fonte*: Adaptado de Mulder (1991).

15.5.9. Cromatografia de troca iônica

Outra metodologia que pode ser utilizada para a recuperação de biossurfactantes é a cromatografia de troca iônica, na qual os biossurfactantes se ligam a resinas trocadoras de íons e podem ser eluídos com tampão específico. Para esse tipo de procedimento é necessário a aquisição de resinas trocadoras de íons empregadas em colunas. Para esse procedimento pode-se destacar a obtenção de biossurfactantes com elevada pureza, além da rápida recuperação do produto.

Os processos cromatográficos, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) podem ser utilizados tanto para purificação quanto para a quantificação do biossurfactante no final do processo. Na literatura é possível encontrar a cromatografia de interação hidrofóbica em biossurfactante de *Streptpcoccus termophilus A*, além de cromatografia líquida de alta eficiência aplicada à quantificação e purificação de *Bacillus subtilis*.

Portanto, o rendimento da extração bem como do biossurfactante está altamente ligado à escolha da metodologia a ser utilizada na extração. Essa

escolha deve ser realizada de acordo com a composição química do biossurfactante.

15.6. Aplicações industriais dos biossurfactantes

A maior parte dos biossurfactantes produzidos é utilizada pelas indústrias petrolíferas. Entretanto, dependendo da função, existem diversos setores nos quais os biossurfactantes também podem ser utilizados. Alguns exemplos são mostrados na Tabela 15.4.

Tabela 15.4

Principais aplicações e funções dos biossurfactantes

Indústria	Aplicação	Função do surfactante
Petrolífera	Limpeza de reservatórios de óleo; aumento da recuperação de petróleo	Reduzir a viscosidade e formar emulsões, facilitando a remoção de óleos pesados depositados em fundos de reservatórios; reduzir as forças capilares estimulando a liberação de óleo através dos poros da rocha.
Ambiental	Biorremediação; remediação de águas e solos	Emulsificação e remoção de hidrocarbonetos; remoção de metais; agente espumante; detergente; dispersante.
Alimentícia	Emulsificação; ingrediente funcional	Emulsionar, favorecendo a consistência e a textura; interação com lipídios, proteínas e carboidratos; agente protetor.
Agrícola	Biocontrole	Emulsionar pesticidas e herbicidas, facilitando a dispersão do composto ativo.
Cosmética	Produtos de higiene e beleza	Emulsificantes; umectantes; espumantes, solubilizantes; mediadores da ação enzimática.
Farmacêutica	Produtos terapêuticos	Inibir formação de coágulos; atividade antibacteriana e antifúngica; vacinas; imunomodulatórios.

Fonte: Singh *et al.* (2007).

15.6.1. Biorremediação

A técnica de biorremediação consiste na aplicação de processos biodegradáveis no tratamento de resíduos para recuperar e regenerar ambientes (água e solo) que sofrem variados impactos negativos. Essa técnica usa de forma controlada, processos microbiológicos que ocorrem na natureza para remover poluentes. Assim, a biorremediação possui papel importante, principalmente na limpeza de contaminação provocada por petróleo e derivados. Pois o excesso de resíduo é capaz de destruir o

equilíbrio natural de um ecossistema, além de levar à destruição de habitats naturais e colocar em risco a saúde humana.

Os biossurfactantes podem contribuir na minimização dos danos ecológicos causados por derramamento de óleo, pois são capazes de aumentar a interação superficial (água/óleo) acelerando a degradação de óleos por micro-organismos, promovendo com isso a biorremediação de solos e água.

Em 1989 houve um dos maiores desastres ecológicos dos Estados Unidos. O acidente com o navio Exxon Valdez, no Alasca, derramou mais de 36 mil toneladas de petróleo bruto no mar. Para a remoção de óleo de cascalhos foram utilizados os biossurfactantes da classe raminolipídios (glicolipídio) produzidos a partir da bactéria *Pseudomonas aeruginosa* SB30. Os resultados demonstraram que esse biossurfactante foi de duas a três vezes mais efetivo na remoção do óleo do que a água. O aumento na concentração do bioemulsificante até 1% e na temperatura até 50° C levou a uma significativa melhora na remoção do óleo. Já o tempo de contato demonstrou um valor ótimo em torno de 1 minuto. Além da melhora quantitativa na remoção, o bioemulsificante não apresentou toxicidade e apresentou maior biodegradabilidade.

15.6.2. Limpeza de reservatórios de óleos

Para a limpeza de reservatórios de óleos, geralmente são necessárias lavagens manuais ou com solventes. No entanto, esses métodos requerem muito cuidado, são demorados e de elevado custo, pois os resíduos e as frações de óleos pesados sedimentados no fundo dos tanques são muito viscosos e de difícil remoção por bombeamento convencional. Assim, um dos processos alternativos para a limpeza desses reservatórios é o uso de biossurfactantes que promovem a diminuição na viscosidade e a formação de emulsões óleo/água. Isso facilita o bombeamento dos resíduos e a recuperação do óleo cru, após quebra da emulsão.

De acordo com a literatura, o bioemulsificante mais utilizado para esta finalidade é o *Emulsan*, produzido pelo *Acinetobacter calcoaceticus RAG-4*. A bactéria *Acinetobacter calcoaceticus* é Gram-negativa e possui a habilidade de crescer em hidrocarbonetos. Seu bioemulsificante consiste em um complexo heteropolissacrídeo-proteína de baixa toxicidade e efetivo em materiais de limpeza e na recuperação de óleos, principalmente pela indústria petrolífera.

15.6.3. Indústria de alimentos

Os biossurfactantes são utilizados na indústria de alimentos, principalmente pela função de estabilização, podendo influenciar na formação da consistência, textura, dispersão de fases e solubilização de aromas. De modo geral, a função dos emulsificantes em alimentos é promover a estabilidade da emulsão pelo controle da aglomeração dos glóbulos de gordura e pela estabilidade em sistemas aerados.

Um sistema emulsionado é caracterizado como um sistema heterogêneo contendo um líquido imiscível disperso em outro na forma de pequenas gotas. Tais sistemas possuem uma estabilidade mínima, a qual pode ser aumentada por aditivos surfactantes que atuam reduzindo a tensão interfacial, diminuindo a energia da superfície entre as duas fases e consequentemente prevenindo a separação física, como a coalescência das partículas, por formação de barreiras estéricas e eletrostáticas e outros mecanismos de separação física como a floculação, a cremeação, a sedimentação e a inversão de fases. Além de prevenir a desestabilização química como a oxidação e hidrólise.

Como exemplos de alimentos emulsionados processados que são beneficiados pelo uso de aditivos emulsionantes estão: creme de leite, manteiga, margarina, maionese, molhos para salada, salsicha, linguiça, sorvetes, bolos, chocolates, recheios e produtos instantâneos como sopas. Na literatura podem ser encontrados biossurfactantes produzidos por levedura *Candida utilis* para aplicação como emulsificante em molhos para salada. Além disso, as leveduras *Candida valida, hansenula anomala, Rhodospiridium diobovatum, Rhodotorula graminis*, as bactérias *Klebsiella sp*. e *Acinetobacter calcoaceticus* e a alga vermelha *Porphiridium cruentum* demonstraram ser bons produtores de biossurfactantes extracelulares com melhor capacidade emulsificante/estabilizante do que a goma arábica e o carboximetilcelulose.

Outra ação dos biossurfactantes na indústria de alimentos é sua atividade antiadesiva, que é desejável para evitar a formação de biofilmes em superfícies com as quais os alimentos vão entrar em contato. Um biossurfactante produzido por uma linhagem termofílica láctea de *Streptococcus sp*. pode ser usado para o controle de contaminação nas placas de troca de calor dos pasteurizadores, já que ele retarda a colonização do *S. termophilus*, responsável pela contaminação.

Apesar da aplicação potencial, a indústria de alimentos não utiliza ainda os biossurfactantes como aditivos em larga escala. Principalmente pelo fato de que para a aprovação de um novo ingrediente são requeridos diversos testes e avaliações relacionados com questões nutricionais, funcionais, sensoriais, biológicas e toxicológicas de acordo com os

regulamentos dos *United States Food and Drug Administration*. Somado a isso, fatores econômicos quando comparados com surfactantes sintéticos, aceitação pelo consumidor, regulação legal e hábitos alimentares também são potenciais influenciadores para liberação do uso de biossurfactantes em alimentos.

Sabe-se que no Japão, onde as restrições legais para o uso de novos ingredientes naturalmente produzidos por processos biotecnológicos não são tão rígidas, podem ser encontradas patentes sobre o uso de soforolipídeos como aditivos para farinha de trigo, parede celular de *Saccharomyces uvarum* hidrolizada e liofilizada aplicada em margarinas, bem como raminolipídeos de *Pseudomonas aeruginosa* para aplicação alimentícia.

15.6.4. Indústria farmacêutica e de cosméticos

Muitos biossurfactantes possuem compatibilidade com a pele humana e por isso são utilizados em vários produtos de higiene e cosméticos como shampoo, hidratantes corporais, cremes faciais entre outros. Alguns biossurfactantes possuem aplicação terapêutica. Como exemplo sabe-se que o Raminolipídeo produzido por *Pseudomonas aeruginosa*, lipolipídeos produzidos por *B. subtilis* e *B. Licheniformis* e lipídeos de manosileritritol produzido por *Candida Antarctica* mostraram atividade antimicrobianas.

Na indústria de cosméticos, os biossurfactantes estão em plena expansão. A empresa *Kao Chemical Corporations*, por exemplo, utiliza soforolipídios comercialmente como umectantes em batons e hidratantes para a pele e cabelos.

Um dos biossurfactantes com propriedades antimicrobianas mais conhecidas na indústria farmacêutica é a surfactina (lipopeptídeo cíclico produzido por cepas *B.subtilis*). Este biossurfactante possui atividade antifúngica e moderada atividade antibacteriana, além disso, estudos mostram atividade antiviral e antitumoral. A iturina, também é um lipopeptídeo produzido por *B. Subtilis* e que também demonstrou atividade antifúngica. De acordo com estudos é capaz de afetar a morfologia e a estrutura da membrana celular de leveduras. Alguns trabalhos *in vitro* já mostraram que a surfactina é capaz de inativar eficazmente o vírus causador de herpes, assim como o retrovírus e outros vírus de RNA e DNA compactados.

Na área médica, os biossurfactantes podem ser utilizados para inibir a adesão e formação de biofilme em próteses e cateteres, encontrando, portanto, aplicações potenciais na profilaxia cirúrgica e cavidade oral,

considerando-se a atividade inibitória de alguns biossurfactantes contra *Streptococcus mutans* e outros patógenos bucais. Biossurfactantes produzidos por bactérias de gênero *Lactobacillus* também são capazes de inibir a adesão de bactérias entéricas e formar biofilme para a colonização da superfície, permitindo que sejam utilizados como probióticos para a prevenção de infecções urogenitais.

15.6.5. Indústria da mineração

Fontes de poluição de águas com metais pesados podem ter origens nas atividades de mineração e em diversas atividades industriais. A remoção de metais pesados em águas superficiais e subterrâneas envolve processos de biossorção a partir de microrganismos, plantas ou biomassa. Os surfactantes polares aniônicos são capazes de interagir com íons de carga contrária por interação eletrostática. Estudos revelam que biossurfactantes presentes em extratos de *Bacillus subtilis* contendo surfactina também demonstraram capacidade para remoção de metais (cobre, níquel e cobalto).

Além disso, compostos tensoativos produzidos por culturas de *Pseudomonas* sp. *e Alcaligenes* sp. também podem ser utilizados para flotação e separação de calcita e eschelita. Estudos mostram que a recuperação foi de 95% para tungstato de cálcio ($CaWO_4$) e 30% para carbonato de cálcio ($CaCO_3$), ressaltando que reagentes químicos convencionais são incapazes de separar estes dois minerais.

15.6.6. Indústria da agricultura

Na agricultura, os biossurfactantes podem ser utilizados na hidrofilização de solos argilosos. Com esse procedimento são obtidos solos com adequada umidade e distribuição uniforme de fertilizantes. Além disso, podem ser utilizados na fabricação de alguns herbicidas e pesticidas para facilitar sua dispersão em soluções aquosas, já que vários compostos ativos dessas formulações são hidrofóbicos. Os biossurfactantes de *Bacillus* já foram utilizados para emulsificar formulações de pesticidas organofosforados imiscíveis. E estudos confirmaram que os raminolipídeos podem ser potenciais controladores biológicos de fitopatógenos produtores de zoósporos.

A Tabela 15.5 mostra a aplicação de alguns biossurfactantes e suas respectivas referências.

Tabela 15.5

Principais aplicações biológicas e biotecnológicas dos biossurfactantes

Aplicações	Biossurfactantes	Referências
Inibição do biofilme e ação antimicrobiana	Lipopeptídeo	Muthu *et al.* (2011)
Inibidor de secreção anti-inflamatória e mediadores de células RBL-2H3	Manosil-eritritol	Morita *et al.* (2011)
Potencial antimicrobiano e antiadesivo	Rufisan	Rufino *et al.* (2011)
Inibição da adesão de Listeria monocytogenes	Ramnolipido e Surfactina	Araújo *et al.* (2011)
Efeitos da hidrofobicidade de superfície celular de PAH degradantes de bactérias e biodegradação do fenantreno	Ramnolipidos	Zhao, Selvam e Wong (2011)
Tratamento de incrustações de águas residuais com óleo de fritura	Ramnolipidios	Qin *et al.* (2012)
Solubilização de carvão e biorremediação de ambientes marinhos contaminados com óleo	Ramnolipdos	Singh; Tripathi (2012)
Inibição de crescimento bacteriano em biofilmes pré-formados	Surfactina	Gomes; Nitschke (2012)

Fonte: Santos (2013).

Vale lembrar que o potencial de obtenção e uso dos biossurfactantes é enorme, porém ainda é pouco utilizado pelas indústrias, já que os custos do processo produtivo ainda não são vantajosos. Por isso, diversos estudos podem ser encontrados na literatura com o intuito de obter processos produtivos com menores custos, principalmente com o uso de substratos de origem renovável.

Sabe-se que há variados processos de extração e concentração de biossurfactantes bem como possibilidade de utilização por diversas indústrias. E que a escolha da melhor metodologia de extração e de aplicação dos biossurfactantes está relacionada com a sua composição química.

Revisão dos conceitos apresentados

Os biossurfactantes são compostos de origem microbiana que exibem propriedades surfactantes, isto é, diminuem a tensão superficial ou possuem capacidade emulsificante e consistem em subprodutos metabólicos de bactérias, fungos e leveduras.

As principais funções fisiológicas do biossurfactante incluem: aderência-liberação da célula a superfícies; atividade antibiótica; transporte de hidrocarbonetos; emulsificação e solubilização de hidrocarbonetos.

Os biossurfactantes estruturalmente apresentam combinações diversas. Dentre os biossurfactantes mais conhecidos, podemos destacar os glicolipídeos (ramnolipídeo), lipopeptídios (surfactina), fosfolipídeos (fosfatidiletanolamina), complexos de proteínas e polissacarídeos, ácidos graxos, lipídios neutros, surfactantes poliméricos (emulsan) e surfactantes particulados.

A composição e as características dos biossurfactantes produzidos por micro-organismos são influenciadas pela natureza das fontes de carbono e nitrogênio utilizadas, assim como pela presença de fósforo, ferro, manganês e magnésio no meio de produção. Além disso, outros fatores, como pH, temperatura, agitação e forma de condução do processo são extremamente importantes na quantidade e na qualidade do biossurfactante produzido. Deste modo, a escolha adequada do meio de cultivo e da forma de condução do processo é um passo importante, uma vez que pode alterar as características estruturais e a produtividade do processo de fermentação.

As indústrias têm investido no estudo de diferentes métodos de extração de biossurfactantes bem como na otimização de processos no intuito de alcançar a eficiência e o baixo custo.

Os métodos de isolamento e remoção de biossurfactante mais estudados e utilizados são os métodos descontínuos, dentre os quais se destaca a extração com solventes. Porém, outros métodos menos prejudiciais ao meio ambiente vêm sendo avaliados.

A maior parte dos biossurfactantes produzidos é utilizada pelas indústrias petrolíferas. Entretanto, diversas indústrias (farmacêutica, alimentícia, mineração, agricultura) são beneficiadas pelas propriedades físico-químicas dos biossurfactantes.

Apesar de os custos de produção dos biossurfactantes ainda não serem satisfatórios para o uso industrial, as pesquisas científicas continuam a buscar novos métodos de produção utilizando substratos de origem renovável e de recuperação mais eficientes e que não provoquem tantos prejuízos ao meio ambiente.

Questões

1. Quais são os fatores que influenciam na produção de biossurfactantes?
2. De acordo com o conhecimento fornecido, descreva a importância do uso de biossurfactantes para as indústrias.

3. Descreva alguns métodos que podem ser utilizados para obtenção de biossurfactantes.
4. Em que tipo de produtos comerciais podemos utilizar os biossurfactantes?
5. Como os biossurfactantes podem auxiliar no desenvolvimento de novos produtos alimentícios e cosméticos?
6. Os biossurfactantes estruturalmente apresentam combinações diversas. Qual a vantagem para indústria?

Tópicos para discussão

1. Discuta o mecanismo de ação dos biossurfactantes.
2. Especule acerca das possíveis funções fisiológicas que os biossurfactantes possuem para os microrganismos que os produzem.
3. Discuta o mecanismo metabólico pelo qual a síntese de biossurfactante acontece em condições limitantes de nitrogênio.
4. Os resíduos industriais despertam grande interesse como alternativa no fornecimento de substrato para a produção de biossurfactantes. Quais os pontos positivos e negativos na escolha de um resíduo industrial.
5. As legislações que envolvem o controle ambiental têm proporcionado maiores pesquisas por surfactantes naturais como alternativa aos sintéticos. Discorra os prós e contras de cada tipo de surfactante.

Sugestões para pesquisa

1. O uso de diferentes fontes de carbono altera a estrutura do biossurfactante produzido pelos micro-organismos. Pesquise a rota metabólica de síntese do biossurfactante, quando a fonte de carbono utilizada for o glicerol.
2. Muitos resíduos são produzidos pelas indústrias, sabendo disso, pesquise algum resíduo e sugira um micro-organismo que poderia utilizá-lo como fonte para produção de biossurfactante.
3. Escolha um tipo de biossurfactante e sugira dois métodos de recuperação desse do meio de cultivo. Indique três possíveis aplicações do biossurfactante.

Referências

Albani, S.F.M. 2008. Métodos alternativos de purificação de polissacarídeo capsular de Haemophilus influenzae tipo b. Dissertação de mestrado em biotecnologia, Universidade de São Paulo, 95 p. Disponível em: file:///C:/Users/Kelly/Downloads/SilviaMariaFerreiraAlbani_Mestrado%20(3).pdf. Acesso em outubro de 2015.

Albrecht A, Rau U, Wagner F. Initial steps of sophoroselipid biosynthesis by Candida bombicola ATCC 22214 grown on glucose. *Applied Microbiology Biotechnology*. 1996;46:67–73.

Antunes, A.A. 2010. Produção, caracterização e aplicação do biossurfactante isolado de Chromobacterium violaceum em meios alternativos e de baixo custo. Tese de Doutorado em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco. 221 p.

Banat IM. Les biossurfactants, plus que jamais sollicités. *Biofutur*. 2000;(198):44–47.

Banat IM, Makkar RS, Cameotra SS. Potential commercial applications of microbial surfactants. *Applied Microbiology Biotechnology*. 2000;53:495–508.

Barros FFC, Quadros CP, Júnior MRM, Pastore GM. Surfactina: propriedades químicas, tecnológicas e funcionais para aplicações em alimentos. *Química Nova*. 2007;30(2):409–414.

Casas J, Garcia-Ochoa FG. Sophorolipid Production by Candida bombicola: Medium Composition and Culture Methods. *Journal of bioscience and bioengineering*. 1999;88(5):488–494.

Cavalero DA, Cooper DG. The effect of medium composition on the structure and physical state of sophorolipids produced by *Candida bombicola* ATCC 22214. *Journal of Biotechnology*. 2003;103(1):31–41.

Davis DA, Lynch HC, Varley J. The application of foaming for the recovery of surfactin from B. subtilis ATCC 21332 cultures. *Enzyme and Microbial Technology*. 2001;28:346–354.

Desai JD, Banat IN. Microbial Production of Surfactants and Their Commercial Potential. *Microbiology and molecular biology reviews*. 1997;61(1):47–64.

Fontes GC, Amaral PFF, Coelho MAZ. Produção de biossurfactante por levedura. *Química Nova*. 2008;31(8):2091–2099.

Harvey S, Elashvilli I, Valdes JJ, Kamely D, Chakrabarty M. Enhanced removal of Exxon Valdez spilled oil from Alaskan gravel by microbial surfactant. *Biotechnology*. 1990;(8):228–230.

Kim HS, Jeon JW, Kim BH, Ahn CY, Mock OHH, Yoon BD. Extracellular production of a glycolipid biosurfactant, mannosylerythritol lipid, by *Candida* sp. SY16 using fed-batch fermentation. *Applied Microbiol Biotechnology*. 2006;70:391–396.

Kitamoto D, Ikegami T, Suzuki GT, Sasaki A, Tkeyama Y, Idemoto Y, Koura Y, Yanagishita H. Microbial conversion of n-alkanes into glycolipid biosurfactants mannosylerytritol lipids, by *Pseudozyma* (*Candida antarctica*). *Biotechnology Letters*. 2001;23:1709–1714.

Lin S, Lin K, Lo C, Lin Y. Enhanced biosurfactant production by a *Bacillus licheniformis* mutant. *Enzime and Microbial Technology*. 1998;23:267–273.

Lopes, P.D. 2015. Purificação parcial dos anticorpos presentes no soro normal através da precipitação da fração gamaglobulina com sulfato de amônio. Disponível em: http://www.fcav.unesp.br/Home/departamentos/patologia/HELIOJOSEMONTASSIER/aula-pratica-2--purificacao-parcial-dos-anticorpos-presentes-no-soro-normal.pdf. Acesso em outubro de 2015.

Mukherjee S, Das P, Sen R. Towards commercial production of microbial surfactants. *Trends in Biotechnology*. 2006;24:509–516.

Mulder, M. 1991. Basic principle of membrane technology. Kluwer Academic Publishers. Disponível em: http://labvirtual.eq.uc.pt/siteJoomla/index.php?Itemid=206&id=57&option=com_content&task=view. Acesso em setembro de 2015.

Mulligan CN, Gibbs. BF. Recovery of biossurfactants by uiltrafiltration. *Journal of Chemical Technology and Biothecnology*. 1990;47:23–29.

Muthusamy K, Gopalakrishnan S, Ravi TK, Sivachidambaram P. Biosurfactants: properties commercial production and application. *Current Science*. 2008;94:736–747.

Navon-Venezia S, Zosim Z, Gottlieb A, Legmann R, Carmeli S, Ron EZ, Rosenberg E. Alasan, a new bioemulsifer from Acinetobacter radioresistens. *Applied and Environmental Microbiology*. 1995;61:3240–3244.

Nitschke M, Pastore GM. Biossurfactantes: Propriedades e aplicações. *Química Nova*. 2002;25:772–776.

Pareilleux A. Hydrocarbon assimilation by *Candida lipolytica*: Formation of a biosurfactant. Effects on respiratory activity and growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1979;8(1-2).

Rau U, Nguyen LA, Romper H, Koch H, Lang S. Fed-batch bioreactor production of mannosylerythritol lipids secreted by *Pseudozyma aphidi*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2005;68(5).

Rodrigues L, Banat IM, Teixeira J, Oliveira R. Biosurfactants: Potential applications in medicine. *Journal of Antimicrobiol Chemotherapy*. 2006;57:609–618.

Rosenberg M, Rosenberg E. Rolle of Adherence in Growth of Acinobater calcoaceticus RAG-1 on Hexadecane. *Journal of Bacteriology*. 1981;148:51–57.

Santos, A.P.P. 2013. Produção de biossurfactante por Streptomyces sp. Isolado de líquens da Região Amazônica para aplicação como agente antifúngico. Mestrado em Biociência Animal. Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 92 p.

Sarubbo LA, Marçal MC, Neves MLC, Silva MP, Porto ALF, Campos-Takaki GM. Bioemulsifier production in batch culture using glucose as carbon source by *Candida lipolytica*. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2001;95.

Shephord R, et al. Novel bioemulsifier from microorganism for use in foods. *Journal of Biotechnology*. 1995;40(3):316–320.

Sheppard JD, Mulligan CN. The production of surfactin by Bacillus subtilis grown on peat hydrolysate. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 1987;27(2):110–116.

Singh P, Cameotra SS. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *Trends Biotechnol*. 2004;22:142–146.

Spectrum® Laboratories. Why spectrum? The fiber with the competitive Edge! Disponível em: http://www.spectrumlabs.com/filtration/Edge.html. Acesso em setembro de 2015.

Syldatk C, Wagner F. In: Kosaric N;, Cairns WL, Gary NCC, eds. *Production of biosurfactant. Biosurfactants and Biotechnology*. New York: Marcel Dekker, cap; 1987:3.

Verikonja N, Kosaric N. *Biosurfactants: production, properties, applicazations*. New York: Marcel Decker, cap; 1993:16.

Zinjarde SS, Pant A. Emulsifier from a tropical marine yeast, Yarrowia lipolytica NCIM 3589. *Journal of Basic Microbiology*. 2002;42:67–73.

Índice Remissivo

B

D

E

H

I

M

Q

R

S

T

U

V

BERNARDO DIAS RIBEIRO
KAREN SIGNORI PEREIRA
RODRIGO PIRES DO NASCIMENTO
MARIA ALICE ZARUR COELHO
(ORGANIZADORES)

MICROBIOLOGIA INDUSTRIAL

ALIMENTOS

VOL. 2

Material na WEB

ELSEVIER

Microbiologia industrial, vol 2

Ribeiro, Bernardo Dias

9788535288087

496 páginas

Compre agora e leia

O livro Microbiologia Industrial: Alimentos tem como objetivo fornecer aos alunos de Química, Biologia, Microbiologia, Engenharia Química, Processos Bioquímicos, Ciência e Tecnologia de Alimentos e áreas afins, a compreensão dos aspectos microbiológicos na produção de alimentos. Este livro vem dividido em 12 capítulos nos quais é possível encontrar uma primeira parte introdutória destacando a existência de micro-organismos benéficos e maléficos no processamento de alimentos, e que o processo de fermentação também pode ser utilizado como conservação além dos já tradicionais métodos físico-químicos. Em um segundo momento, há

capítulos focados na geração de produtos em que o próprio micro-organismo é o alimento, como biomassa em si, ou como probióticos, ou em que o mesmo é agente promotor como no caso da produção de bebidas fermentadas como cerveja, vinho, espumantes, cachaça, entre outras; de alimentos orientais, de fermentados vegetais lácteos, de derivados lácteos e de vinagre. Um foco diferente foram os capítulos finais em que os micro-organismos geraram aditivos alimentares como edulcorantes e ácido cítrico que posteriormente servirão a formulações alimentares. Nesse projeto foram envolvidos cerca de 10 Instituições de Ensino Superior do Brasil e de Portugal e 24 autores com reconhecida competência nos assuntos abordados.

CLAUDINEI DE SOUZA GUIMARÃES

CONTROLE E MONITORAMENTO DE POLUENTES ATMOSFÉRICOS

ELSEVIER

Material na WEB

área. Diversas técnicas de monitoramento utilizadas no cotidiano são exploradas neste livro, suas aplicações e objetivos. O monitoramento da qualidade do ar tem como principal objetivo dar indicativos na elaboração de medidas a fim de minimizar as emissões dos poluentes na atmosfera, contribuindo assim para a melhoria da qualidade de vida da sua população e do ambiente, além de cumprir as normas ambientais de emissões. A obra visa: - ensinar as principais medidas tomadas para controlar e monitorar os compostos emitidos na atmosfera; - ensinar vários processos de redução e controle; - explicar a aplicação dos principais equipamentos utilizados no controle e monitoramento da poluição atmosférica; - esclarecer o leitor sobre o tratamento estatístico dos resultados, validações, estações de monitoramento; - estimular o leitor a realizar as simulações a partir de modelos matemáticos para os cálculos das concentrações dos poluentes emitidos pela chaminé.


LUIZ PAULO FÁVERO | PATRÍCIA BELFIORE
MANUAL DE
ANÁLISE DE DADOS
Estatística e Modelagem Multivariada com
Excel®, SPSS® e Stata®
ELSEVIER

Manual de Análise de Dados

Favero, Luiz Paulo

9788535285055

1216 páginas

Este livro, em que são abordadas as principais técnicas estatísticas e de modelagem multivariada, é resultado de vários anos de estudo e pesquisa e enfatiza a importância da análise de dados em ambientes acadêmicos e organizacionais, podendo ser considerado o principal fruto de inúmeras discussões e elucubrações sobre a importância da modelagem aplicada voltada à tomada de decisão.O princípio básico do livro consiste em explicitar, a todo instante, a hierarquia entre dados, informação e conhecimento . Os dados, quando tratados e analisados, transformam-se em informações. Já o conhecimento é gerado no momento em que tais

informações são reconhecidas e aplicadas na tomada de decisão. Analogamente, a hierarquia reversa também pode ser aplicada, visto que o conhecimento, quando difundido ou explicitado, torna-se determinada informação que, quando desmembrada, tem capacidade para gerar um conjunto de dados.



Metodologia de Pesquisa para Ciência da Computação

Raul Sidnei Wazlawick





Metodologia de Pesquisa para Ciência da Computação

Wazlawick, Raul

9788535277838

168 páginas

Compre agora e leia

A presente obra condensa mais de 16 anos de experiência na orientação de trabalhos de graduação, especialização, mestrado e doutorado. O livro apresenta o tema "metodologia da pesquisa de forma agradável, fundamentada e baseando-se sempre em histórias ilustrativas sobre como fazer e também como não fazer um trabalho terminal de curso de computação. A ênfase principal do livro está na caracterização do trabalho científico em ciência da computação, visto que a experiência do autor em bancas examinadoras e na avaliação de artigos científicos demonstra a dificuldade que

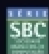
muitos alunos de computação têm em compreender e aplicar a metodologia científica a seus trabalhos.

Compre agora e leia

LEANDRO AUGUSTO DA SILVA
SARAJANE MARQUES PERES
CLODIS BOSCARIOLI



Introdução à
MINERAÇÃO DE DADOS
Com aplicações em R



ELSEVIER

Introdução à Mineração de Dados

Silva, Leandro Augusto da

9788535284478

296 páginas

Compre agora e leia

A quantidade de dados gerada atualmente tem extrapolado a capacidade humana de interpretação. O armazenamento de todo tipo de informação que antes era objeto de desejo de grandes e até médias empresas, agora se torna um desafio de como analisar essa superabundância de dados. A este desafio em específico está o interesse em determinar ações estratégicas, visando à descoberta de conhecimento em bases de dados para aumentar vendas, definir perfis e sugerir produtos relacionados. A descoberta de conhecimento constitui-se de um processo, cuja primeira etapa tem o objetivo de fazer um pré-processamento na base

de dados para entregar a fase seguinte os dados limpos, preparados e selecionados. A fase seguinte, que é principal, esta a Mineração de Dados. Nessa etapa, algoritmos de aprendizado de máquina ou de redes neurais artificiais são executados sobre os dados, a fim de criar um modelo que auxilie em tarefas como classificação, agrupamento e associação de dados. Finalmente, como última etapa, os resultados da mineração são interpretados e analisados qualitativamente e quantitativamente. Diante o exposto, nota-se que é uma área interdisciplinar e exige do leitor uma grande diversidade de experiências que envolvem, basicamente: banco de dados, álgebra linear, matemática discreta e algoritmos. Nesse sentido, esta obra tem como objetivo a apresentação destes assuntos de forma contextualizada, de modo a facilitar o entendimento de um problema e sua resolução através de algoritmos escritos em pseudo-códigos e executados em passo a passo. Adicionalmente, os problemas resolvidos analiticamente são também simulados em uma ferramenta case. Com estas estratégias, esta obra

constitui-se de uma visão bastante pragmática dos algoritmos de Mineração de Dados e suas utilizações em estudos de casos reais resolvidos e simulados.